

Variabilität des Interleukin-4-Rezeptor-Gens: Definition von Haplotypen und Assoziationsanalysen zur Atopie und Multiplen Sklerose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Henrike Annette Hofmann
aus Potsdam

Gießen, 2004

Aus dem Zentrum für Klinische Chemie, Klinische Immunologie und Humangenetik
Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
des Universitätsklinikums Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. G. Bein

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Gutachter: PD Dr. P. Oschmann

Tag der Disputation: 27.09.2004

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	Seite
1.1	Interleukin-4	1
1.2	Th1-/ Th2-Paradigma	2
1.2.1	Differenzierung der T-Helferzellen	3
1.3	IL-4-Rezeptor	4
1.3.1	Aufbau, Vorkommen und Funktion des IL-4-Rezeptors	4
1.3.2	IL-4R-Kette	5
1.3.3	Signaltransduktion	6
1.4	<i>Single-nucleotide-polymorphisms</i> im IL4R-Gen	9
1.5	IL-4 in der Pathogenese der Atopie	11
1.6	Genetische Untersuchungen zur Atopie	12
1.6.1	Genomweite Kopplungsanalysen	13
1.7	IL4R: Genetische Assoziationsstudien	14
1.8	IL-4 in der Pathogenese der Multiplen Sklerose	16
1.8.1	Genetische Untersuchungen zur MS	19
1.8.2	Kopplungs- und Assoziationsanalysen zur MS	19
1.8.3	IL4R und MS	20
1.9	Natürliche Varianten der IL-4R-Kette: Funktionelle Bedeutung für die Signaltransduktion	20
1.10	Zielsetzung	21
2.	MATERIALIEN	23
3.	METHODEN	
3.1	Patienten und Probanden	27
3.1.1	Gruppe der Atopiker und Kontrollpersonen	27
3.1.2	Gruppe der Multiple Sklerose-Kranken	27
3.2	DNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	29
3.3	Nomenklatur der IL4R-Polymorphismen	29
3.4	Oligonukleotid-Primer	30
3.5	Polymerase-Kettenreaktion	32
3.5.1	PCR mit sequenzspezifischen Primern	32
3.5.2	HLA-DRB1*15-Primer	33
3.6	DNA-Gelelektrophorese	33
3.7	DNA-Sequenzierung	34
3.8	Allergie Tests	35
3.9	Bestimmung der <i>myelin-oligodendrocyte-glycoprotein</i> -Autoantikörper	36
3.10	Durchflußzytometrische Analyse der CD23-Expression	36
3.10.1	Lymphozyten-Gewinnung	36
3.10.2	Lymphozyten-Kultur	36
3.10.3	Antikörpermarkierung	37
3.10.4	Durchflußzytometrie	37

3.10.5	Darstellung der Messergebnisse	38
3.11	Statistische Auswertung	40
3.11.1	Genetische Assoziation	40
3.11.2	CD23-Expression auf B-Lymphozyten	40

4. ERGEBNISSE

4.1.	PCR-SSP Genotypisierung	41
4.1.1	Validierung der PCR-SSP-Ergebnisse	42
4.2	Allelfrequenzen der IL4R-SNPs	42
4.3	IL4R-Haplotypstruktur	43
4.4	Genetische Assoziation mit Atopie-Phänotypen	44
4.4.1	Assoziation der biochemischen Atopiemarker mit der Atopieanamnese	44
4.4.2	Assoziation der IL4R-SNPs mit Atopiemarkern	44
4.5	Genetische Assoziation mit Multipler Sklerose	45
4.5.1	IL4R-Varianten bei MS-Patienten und Kontrollpersonen	45
4.5.2	Assoziation der IL4R-SNPs mit <i>myelin-oligodendrocyte-glycoprotein</i> -Autoantikörpern	46
4.5.3	Assoziation der L411 und R551 mit den MS-Hauptformen	47
4.5.4	Stratifizierung in HLA-DRB1*15-positive und -negative MS-Patienten	48
4.6	CD23-Expression auf B-Lymphozyten nach IL-4 Stimulation	49
4.6.1	Vorversuche	49
4.6.2	IL-4 induzierte CD23-Expression	50

5. DISKUSSION

5.1	Kopplung zwischen genetischen Varianten in der chromosomalen Region 16p12 und Atopie	54
5.2	Assoziation zwischen genetischen Varianten im IL4R und Atopie	54
5.2.1	Definition atopischer Phänotypen	54
5.2.2	IL4R-Genotypisierung und IL4R-Allelfrequenzen	55
5.2.3	IL4R-Haplotypen	56
5.2.4	Assoziation zwischen IL4R-SNPs und Atopie	58
5.3	Assoziation von IL4R-SNPs mit Multipler Sklerose	63
5.3.1	IL4R-Allelfrequenzen	63
5.3.2	Assoziation der IL4R-SNPs mit MOG-Autoantikörpern	64
5.3.3	HLA-DRB1*15-Stratifizierung	64
5.4	Assoziation von IL4R-SNPs mit anderen Krankheiten	65
5.5	Populationsgenetische Effekte in Assoziationsanalysen	66
5.6	Epistasie bei polygenen Erkrankungen	67
5.7	Einfluss der IL-4-Rezeptorvarianten auf die Signaltransduktion	67
5.7.1	Funktionelle Bedeutung von IL-4R-Varianten für die Signaltransduktion	68

6.	LITERATURVERZEICHNIS	70
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	92
8.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	94
9.	ANHANG	
9.1	Standartfragebogen Atopie	96
9.2	Nukleotidsequenz der mRNA des human IL4RA	97
9.3	Abb. 8: Schematische Darstellung der Signaltransduktion	98
10.	DANKSAGUNG	99
11.	LEBENS LAUF	100
12.	ZUSAMMENFASSUNG	101

PUBLIKATIONEN

Hackstein H, Hofmann H, Bohnert A, Bein G: Definition of Human Interleukin-4 Receptor Alpha Chain Haplotypes and Allelic Association with Atopy Markers. Hum Immunol 60: 1119- 1127, 1999

Hofmann H, Hackstein H, Bohnert A, Bein G: Definition of human interleukin-4 receptor alpha chain haplotypes and allelic association with atopy markers. Poster, 14th European Histocompatibility Conference, Montpellier, France, 2000

Hackstein H, Bitsch A, Bohnert A, Hofmann H, Weber F, Ohly A, Linington C, Mäurer M, Poser S, Rieckmann P, Bein G: Analysis of interleukin-4 receptor α chain variants in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 113: 240- 248, 2001

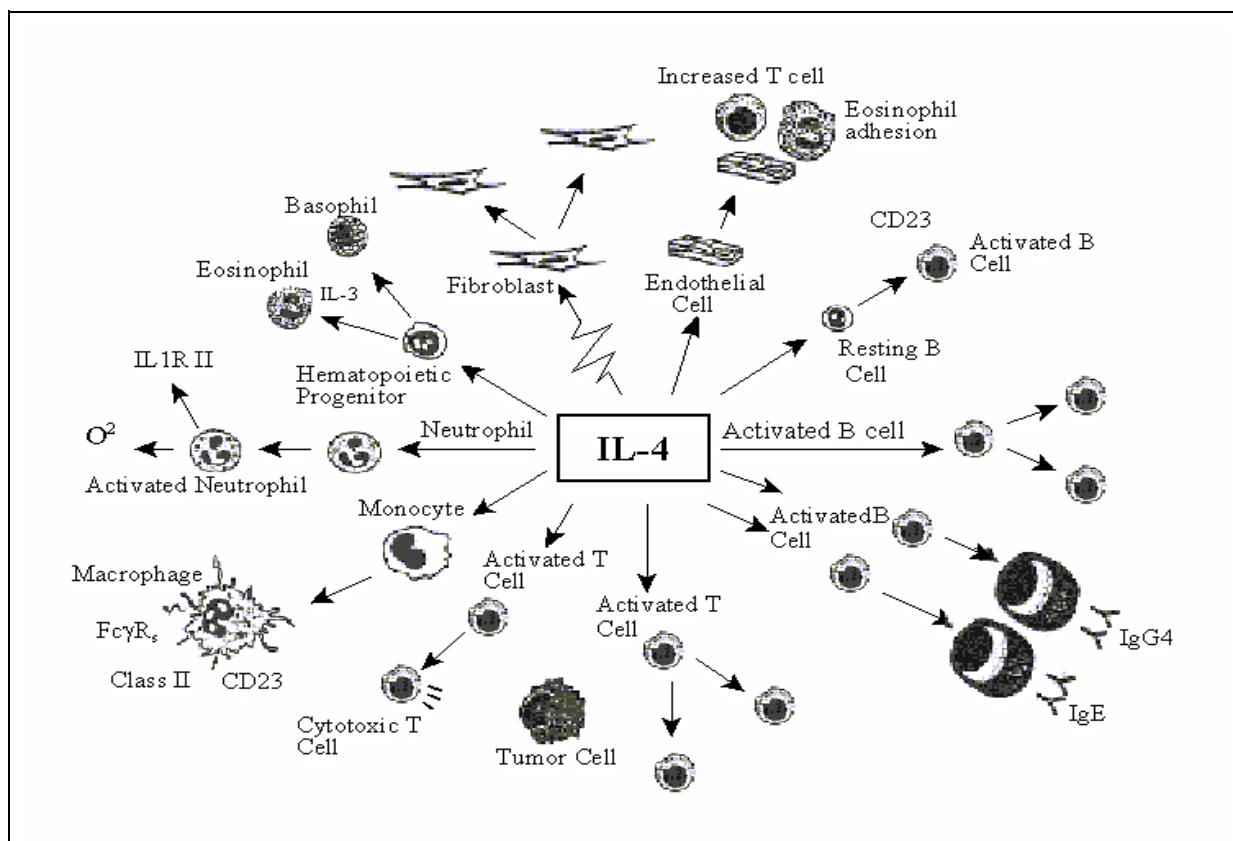
1. EINLEITUNG

1.1 Interleukin-4

Interleukin-4 (IL-4) ist ein zentrales Zytokin in der Regulation der adaptiven Immunantwort. Zytokine sind für Proliferation, Differenzierung und Funktionsaktivierung von Zellen, v.a. innerhalb des hämatopoetischen Systems, verantwortlich. Sie wirken meist lokal autokrin oder parakrin, aber auch systemisch. Zu den Zytokinen gehören Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Chemokine, koloniestimulierende Faktoren und Tumornekrosefaktoren. Die Nomenklatur der Zytokine ist aufgrund ihrer Entdeckungsgeschichte nicht einheitlich. IL-4 gehört zusammen mit IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21, GM-CSF und Erythropoetin zur Strukturfamilie der Hämatopoetine (Heldin CH, 1995. Parrish-Novak J et al, 2000).

IL-4 wird von T-Zellen, Thymozyten, Mastzellen und basophilen Granulozyten synthetisiert (Plaut M et al., 1989. Barcena A et al., 1991) und hat ein breites Spektrum an Zielzellen (Abb.1).

Abb. 1: Pleiotrope Wirkung von IL-4 (nach Chomarat P, Banchereau J, 1997)



IL-4 wurde erstmals 1982 von Howard M et al. als „*B-cell-growth-factor*„ (BCGF1) beschrieben, ein Wachstumsfaktor für aktivierte B-Lymphozyten. In den folgenden Jahren wurden weitere Wirkungen auf unterschiedliche Zellarten gefunden, so dass IL-4 als pleiotroper Wachstums- und Differenzierungsfaktor gilt (Paul WE, 1991. Boulay JL, Paul WE, 1992).

Eine zentrale Rolle spielt IL-4 in der Regulation von B- und T-zellvermittelten Immunantworten (Paul WE, 1991. Paul WE, Seder RA, 1994). IL-4 ist entscheidend für die Differenzierung von T-Helferzellen, induziert den Immunglobulinisotypenswitch nach IgE (Mandler R et al., 1993. Chomarat P, Banchereau J, 1997. Choi P, Reiser H, 1998) und steigert die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen, CD23-Molekülen und des IL-4 Rezeptors auf B-Zellen (Noelle R et al., 1984. DeFrance T et al., 1987. Ohara J et al., 1988).

1.2 Th1-/ Th2- Paradigma

In der Regulation der adaptiven Immunantwort nehmen die T-Lymphozyten eine zentrale Position ein. Dabei fällt einer Subklasse, den T-Helferzellen (Th-Zellen, CD4+ T-Zellen), die Koordination der verschiedenen Abwehrreaktionen durch Aktivierung der dafür notwendigen Effektorzellen zu (Coffman RL et al., 1991. Seder RA, Paul WE, 1994. Constant SL et al., 1997). Nach dem Spektrum der von ihnen gebildeten Zytokine können sie in Helferzellen des Th1- und Th2-Typs eingeteilt werden (Romagnani S, 1991. Miossec P, 1993. Romagnani S, 1994). Th1-Zellen produzieren v.a. IFN γ , IL-12 und TNF β . Th2-Zellen sind für die Synthese von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 sowie IL-13 verantwortlich (Mosmann TR et al., 1986. Mosmann TR, Coffman RL, 1989).

Diese zwei antagonistischen Helferzellpopulationen entscheiden über die Richtung der Immunantwort. Die Konsequenz dieser Differenzierung ist weitreichend:

Aktivierte Th1-Zellen haben vorwiegend die Funktion der Makrophagenaktivierung. Dabei gilt IFN γ als Schlüsselzytokin. Die Makrophagenaktivierung führt zu Effektormechanismen, die für eine erfolgreiche Zerstörung intrazellulärer Erreger (z.B. Mycobacterium, Salmonella) verantwortlich sind (zelluläre Immunität). Th1-Zellen sind mit Autoimmunerkrankungen wie z.B. Multiple Sklerose, Rheumatoide Arthritis und insulinpflichtigem Diabetes mellitus assoziiert, die auf eine fehlgesteuerte Aktivierung von Th1-Zellen zurück zu führen sind.

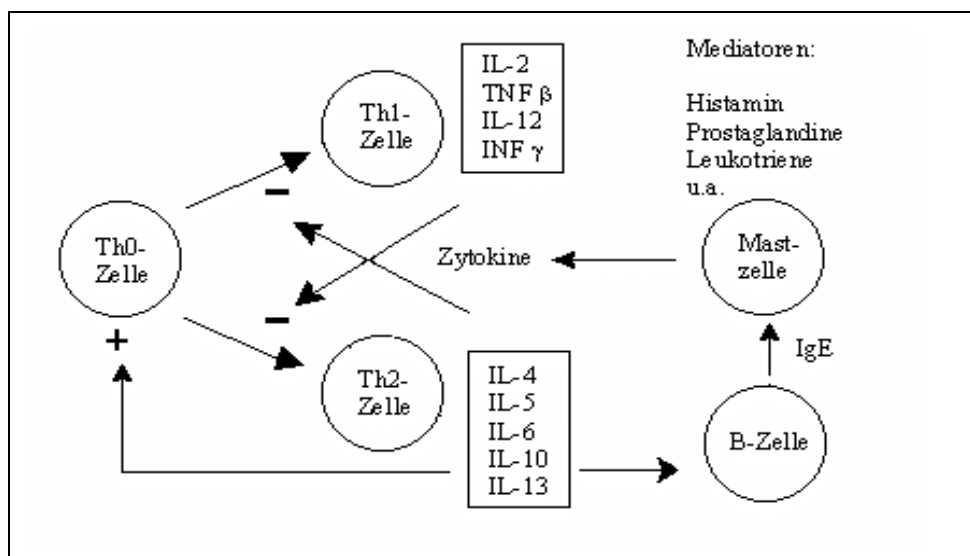
Aktivierte Th2-Zellen leiten die Antikörperproduktion ein und sind so v.a. für die Immunabwehr von extrazellulären Erregern und Toxinen verantwortlich (humorale

Immunität). Das entscheidende Zytokin der Th2-Zellen ist IL-4, welches essentiell für den IgE- Isotypenwechsel in den B-Lymphozyten ist (Choi P, Reiser H, 1998). Lediglich der eng verwandte Faktor IL-13 ist beim Menschen (nicht bei der Maus) ebenfalls zur Induktion von IgE in der Lage (Punnonen J et al., 1993. Defrance T et al., 1994). Allergien vom Soforttyp wie z.B. allergisches Asthma, Hausstauballergie und Pollenallergie sind auf eine fehlgesteuerte Aktivierung von Th2-Zellen zurückzuführen.

1.2.1 Differenzierung der T-Helferzellen

Die zentrale Rolle von IL-4 in der Regulation der Th1- und Th2-Zellen (Morel PA, Oriss TB, 1998) zeigt Abbildung 2. Werden Antigene von antigenpräsentierenden Zellen (APC) aufgenommen, verarbeitet und auf MHC-Klasse II-Molekülen den naiven CD4⁺ T-Zellen (Th0-Typ) präsentiert, leitet dies die Differenzierung in eine der beiden Subpopulationen von T-Helferzellen ein (Sad S, Mosmann TR, 1994). Die Entscheidung, wie sich eine naive CD4⁺ T-Zelle differenziert, fällt bei ihrem ersten Kontakt mit einem Antigen (Nakamura T et al., 1997a). Die Differenzierung ist von einigen Faktoren abhängig: der Affinität des T-Zellrezeptors zum Antigen, der Antigenkonzentration, dem Typ der APC und dem umgebenden Zytokinmilieu (Abbas AK et al., 1996. Nakamura T et al., 1997b).

Abb. 2: Th1/Th2-Differenzierung (nach Wjst M, 1998)



Die zentralen Faktoren für die Ausprägung eines T-Zell-Phänotyps im Rahmen der Antigenpräsentation sind IL-12 für Th1-Zellen (Scott P, 1993) und IL-4 für Th2-Zellen (Coffman RL et al., 1991. Seder RA, Paul WE, 1994. Demeure CE et al., 1995).

Die Zytokine IL-4 und IFN γ regulieren dabei die Produktion der Immunglobulinisotypen reziprok (Snapper CM, Paul WE, 1987), wobei IL-4 die Synthese von IgE induziert, während IFN γ die IgE- Synthese hemmt (Gajewski TF et al., 1989).

1.3 IL-4-Rezeptor

Da IL-4 seine biologische Funktion über die Bindung an den IL-4-Rezeptorkomplex ausübt, stellt der IL-4-Rezeptor (IL-4R) selbst eine essentielle Komponente des IL-4-Signalweges dar. Der humane IL-4R wurde von zwei Forschergruppen fast zeitgleich beschrieben (Idzerda RL et al., 1990. Galizzi JP et al., 1990). Das Gen der IL-4R α -Kette (IL4R) liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 16 im Bereich der Bande 12.1 (Pritchard MA et al., 1991). Durch die Aminosäuresequenz im extrazellulären Rezeptorteil lässt sich der IL-4R den Zytokinrezeptoren der Hämatopoetin-Superfamilie zuordnen (Bazan JF, 1990. Cosman D, 1993).

Die bereits erwähnten IL-4-induzierten Wirkungen auf eine Vielzahl von Zellen spiegeln zugleich auch die weite Expression des IL-4R wieder, v.a. auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs. So findet man den IL-4R mit einer Anzahl von 100 bis 5000 Molekülen pro Zelle (Lowenthal JW et al., 1988) auf B- und T-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Endothelzellen sowie Fibroblasten (Paul WE, 1991. Chomarat P, Banchereau J, 1997).

1.3.1 Aufbau, Vorkommen und Funktion des IL-4-Rezeptors

Der funktionelle IL-4R ist ein heterodimerer Rezeptorkomplex. IL-4 bindet an die hochaffine IL-4R α -Kette (IL-4R, CD124), einem 140 kDa-Protein, das auf vielen Zelltypen exprimiert wird (Mosley B et al., 1989. Idzerda RL et al., 1990. Galizzi JP et al., 1990). Als zweites Rezeptorprotein fungiert die *common*- γ -Kette (Watanabe S et al., 1995), ein 65 kDa-Protein (γ -Kette, CD132). Diese Kette ist Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 (Sugamura K et al., 1995. Kondo MT et al., 1993. Russel SM et al., 1993).

Auch mit der IL-13R α 1-Kette bildet der IL-4R ein Heterodimer (Hilton DJ et al., 1996. Aman MJ et al., 1996. Murata T et al., 1998a). IL-4R allein ist ebenfalls zur Signaltransduktion fähig (Lai SY et al., 1996. Fujiwara H et al., 1997. Reichel M et al., 1997), aber erst in Kombination mit einem Partner werden optimale Signalübertragungen erreicht (Murata T et al., 1998a. Izuhara K et al., 1996. Moriggl R et al., 1998). Dabei steigert die *common*- γ -Kette, die allein

keine Zytokine binden kann, in lymphoiden Zellen die Affinität von IL-4R α zum IL-4 um das 2-3 fache und dient so der Signalverstärkung (Russel SM et al., 1993).

Es werden zwei IL-4R-Typen unterschieden, die auf verschiedenen Zellen vorkommen:

1. Typ I: der klassische IL-4R ist ein Heterodimer aus der hochaffinen IL-4R-Kette und der γ -Kette. Dieser Rezeptortyp ist auf den meisten hämatopoetischen Zellen ausgeprägt.
2. Typ II: dieser IL-4R besteht aus der IL-4R α -Kette und der niedrigaffinen IL-13R α 1-Kette und kommt auf nicht-hämatopoetischen Zellen vor (Zurawski SM et al., 1995).

Im Gegensatz zum Typ I-Rezeptorkomplex bindet IL-13 auch am Typ II-Rezeptorkomplex. Für den humanen IL-13R sind zwei Komponenten (IL-13R α 1 und IL-13R α 2) identifiziert worden, die IL-13 binden können (Aman MJ et al., 1996. Caput D et al., 1996). Die Expressionsmuster dieser beiden Komponenten differieren auf verschiedenen Zellen und Geweben (Gauchat JF et al., 1997). Die molekulare Zusammensetzung des funktionellen humanen IL-13R ist noch offen; jedenfalls ist IL-4R α notwendig zur Entwicklung ausreichender Bindungsaktivität gegenüber IL-13 (Zurawski SM et al., 1993. Lin J-X et al., 1995. Aman MJ et al., 1996).

Zusätzlich zur membrangebundenen Form der IL-4R α -Kette existieren noch lösliche Rezeptorformen. Neben einer Variante, die durch limitierte Proteolyse entsteht (Jung T et al., 1999), fand man in neueren Untersuchungen eine weitere Form (sIL-4R), die durch alternatives mRNA- *Splicing* gebildet wird (Kruse S et al., 1999a). Im Vergleich zu Gesunden zeigte sich bei Atopikern eine niedrigere sIL-4R-Konzentration im Blut (Schauer U et al., 1995). sIL-4R-Moleküle stellen Regulatorproteine in der IL-4-Aktivität dar. Sie fungieren als Transportproteine für IL-4 und als natürliche Antagonisten, indem sie die IL-4-Bindung an Zielzellen hemmen (Fernandez-Botran R, Vitette ES, 1991. Jung T et al., 1999).

1.3.2 IL-4R -Kette

Die Klonierung der cDNA von IL-4R führte zu einer ersten Charakterisierung der Funktionsweise (Idzerda RL et al., 1990. Galizzi JP et al., 1990). IL-4R ist ein 140 kDa-Glykoprotein, bestehend aus 800 Aminosäuren. Das Vorläufermolekül trägt ein 25 Aminosäuren langes Signalpeptid (Miyajima A et al., 1992). Der extrazelluläre Teil besteht aus 207 Aminosäuren und besitzt die für die Hämatopoetinrezeptorfamilie typischen zwei Merkmale: vier hochkonservierte Cysteinreste in der membrandistalen Domäne, das

Aminosäuremotiv WSxWS in der membranproximalen Domäne, wobei x für eine nicht-konservierte Aminosäure steht (W- Tryptophan, S- Serin). Der transmembranäre Teil besteht aus 24 Aminosäuren, das zytoplasmatische Fragment ist 569 Aminosäuren lang.

Die intrazellulären Segmente der Zytokinrezeptoren weisen im Gegensatz zur extrazellulären Domäne bei großen Längenunterschieden nur in einigen kurzen Fragmenten Sequenzhomologien mit anderen Zytokinrezeptoruntereinheiten auf (Bazan JF, 1990. Harada N et al., 1992. Duschl A, Sebald W, 1996). Daher ist über die Funktionsweise dieser Domänen nur wenig bekannt. In zahlreichen Studien wurde der funktionelle Aufbau des intrazellulären Teils von IL-4R untersucht. Trotz der kontroversen Ergebnisse, bedingt durch die Nutzung unterschiedlicher Zellarten, kristallisierten sich vier für die Signalvermittlung bedeutende Regionen heraus (siehe Anhang 9.3, Abb. 8).

1. Box 1-Region: bindet und aktiviert JAK-Moleküle (Ihle JN et al., 1995. Fujiwara H et al., 1997). Sie beginnt 237 Aminosäuren (AS) vom Start des reifen Proteins und hat die Sequenz WWDXIPXP (Harada N et al., 1998).
2. ID-1-Region: liegt zwischen AS 328 und 368 und ist reich an Glutaminsäure und nicht homolog zu anderen bekannten Molekülen. Sie ist bedeutend für die Auslösung der Zellproliferation und STAT6-Aktivierung (Harada N et al., 1992. Harada N et al., 1998. Seldin DC, Leder P, 1994. Schultz C et al., 1995).
3. Insulinrezeptor/ IL-4R (I4R)-Region: so benannt, da eine homologe Sequenz auch im Insulinrezeptor vorkommt. Sie liegt zwischen AS 412 und 532 und ist notwendig für die Tyrosinphosphorylierung von IRS-1/2, für die Zellproliferation und den Antiapoptoseeffekt von IL-4. Besonders bedeutend ist der Tyrosinrest Y472, der von dem I4R-Motiv umgeben ist (Keegan AD et al., 1994. Quelle FW et al., 1995. Wang HY et al., 1996. Zamorano J et al., 1996).
4. STAT6-Region: zwischen AS 533 und 632, enthält Y550, Y578 und Y606. Diese Tyrosinreste im membrandistalen Teil sind bedeutend für die Aktivierung von STAT6. Dabei reicht einer der Tyrosinreste aus, STAT6 zu aktivieren (Quelle FW et al., 1995. Wang HY et al., 1996. Ryan JJ et al., 1996. Ryan JJ et al., 1998).

1.3.3 Signaltransduktion

In den letzten Jahren beschäftigten sich zahlreiche Forschergruppen mit der ligandeninduzierten Aktivierung des IL-4R und der daraus resultierenden intrazellulären Signalfortleitung (Nelms K et al., 1999. Murata T et al., 1998b. Izuhara K et al., 1999). Dabei

wurden nach IL-4-Stimulierung in unterschiedlichen Zelltypen eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionswegen nachgewiesen. Die Beteiligung der verschiedenen Reaktionswege an der IL-4-Signaltransduktion ist daher von der untersuchten Zellart abhängig.

Für die Auslösung der Signalkaskade von Zytokinen der Hämatoepoetin-Superfamilie wird ein zweistufiger Mechanismus postuliert (Bazan JF, 1990):

1. Ligandenbindung: IL-4 bindet über Glu⁹ und Arg⁸⁸ an die hochaffine IL-4R α -Untereinheit. (Wang Y et al., 1997)
2. Rezeptordimerisierung: Bindung einer weiteren Untereinheit (IL-13 α bzw. γ -Kette) an den intermediären Ligand-Rezeptorkomplex.

Diese Dimerisierung, die ein allgemeiner Mechanismus bei Hämatoepoetinrezeptoren zu sein scheint (Heldin CH, 1995), führt zur Phosphorylierung nachgeschalteter Substrate und Signalproteine. Die vom IL-4R ausgehenden Signalwege sind für unterschiedliche Zellreaktionen zuständig, wie Differenzierung, Proliferation und Hemmung von Apoptose. Ein prominentes Signalereignis ist die Aktivierung von Tyrosinkinasen. Die Abbildung 8 (siehe Anhang 9.3) gibt einen Überblick über die bekannten, teilweise unabhängigen Signaltransduktionswege. Eine Signalkaskade im IL-4-System, deren Weiterleitung bis in den Nukleus untersucht ist und bis zur Genexpression (z.B.: von IgE, CD23, MHC-Klasse II, IL-4, IL-4R α) verfolgt werden kann, ist der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg. Der Übertragungsweg mittels Janus-Kinasen (JAK) und *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Molekülen spielt dabei nicht nur für IL-4 und IL-13 eine bedeutende Rolle, sondern auch für zahlreiche andere Zytokine und Wachstumsfaktoren (Schindler C et al., 1995).

JAK-STAT-Signaltransduktionsweg

Der JAK-STAT-Weg überträgt zytokininduzierte Signale von der Zellmembran in den Nukleus. IL-4 aktiviert JAK-1, JAK-3 und nachfolgend STAT6 (Ihle JN, 1995. Lin J-X et al., 1995. Welham MJ et al., 1995. Orchansky PI et al., 1997).

Die Bindung von IL-4 an die IL-4R α -Kette führt zur Rezeptordimerisierung und zur Rekrutierung zytoplasmatischer Enzyme, die mit dem Rezeptor assoziiert sind (Duschl A, Sebald W, 1996). Dabei ist JAK1 mit der IL-4R-Kette assoziiert, JAK3 mit der γ -Kette. Es wird vermutet, dass JAK1 mit einer membrannahen Region des zytoplasmatischen Teils der IL-4R-Kette interagiert, die u.a. das Box1-Motiv (AS 262-267) trägt (Deutsch HH et al.,

1995. Harada N et al., 1998). JAK3 hingegen benötigt zur Aktivierung das I4R-Motiv, das sich im membranfernen Teil der zytoplasmatischen Domäne (AS 437-557) der γ -Kette befindet (Harada N et al., 1998).

Die Aktivierung von JAK1 und JAK3 führt zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der IL-4R-Kette und von zytoplasmatischen Signalmolekülen wie dem STAT6-Molekül (Ihle JN, Kerr IM, 1995). STAT6 bindet über eine PTB-Domäne an die phosphorylierten Tyrosinreste Y578 und Y606 der IL-4R-Kette (Hou J et al., 1994). Das wiederum ermöglicht den aktivierten Kinasen, STAT6 zu phosphorylieren, wodurch es sich vom Rezeptor löst. Die phosphorylierten STAT-Monomere dimerisieren daraufhin miteinander und wandern in den Kern, wo sie an spezifischer Genregulation beteiligt sind (Kotanides H, Reich NC, 1996. Nelms K et al., 1999).

IRS-1/2

IRS (*Insulin receptor substrate*)-Moleküle spielen eine zentrale Rolle bei der IL-4- und IL-13-induzierten Zellproliferation (Keegan AD et al., 1994). Da das früher als 4PS (IL-4 *induced phosphotyrosin substrates*) bezeichnete Molekül (Chomarat P, Banchereau J, 1997) wesentliche Strukturmerkmale zum IRS-1, dem wichtigsten Phosphorylierungssubstrat der Rezeptoren für Insulin und IGF-1, aufweist, wurde es später als IRS-2 bezeichnet (Wang LM et al., 1993. Sun XJ et al., 1995).

Für die Aktivierung der IRS-Moleküle ist der im I4R-Motiv enthaltene Tyrosinrest Y472 bzw. 497 bedeutend (Keegan AD et al., 1994. Harada N et al., 1998). Das IRS-2-Molekül bindet an den Phosphotyrosinrest über eine PTB-Domäne (Wolf G et al., 1995. Zhou MM et al., 1996) und wird selbst phosphoryliert. Für die Phosphorylierung des Tyrosinrestes ist JAK1 ausschlaggebend (Yin T et al., 1994. Chen XH et al., 1997. Wang HY et al., 1997), wobei durch *in vitro*-Experimente diese Fähigkeit auch für die JAK2 und 3 nachgewiesen werden konnte (Keegan AD et al., 1994). Aktivierte IRS-Moleküle fungieren über spezifische SH-2-Domänen als Ankerproteine für andere Signalmoleküle, z.B. der 85kDa-Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-K) und des Adaptermoleküls Grb-2. Dieser Komplex löst sich von IL-4R und leitet weitere Signalwege ein wie den PI-3-Kinase (Phosphatidylinositol 3-Kinase) -Weg und den MAPK (Mitogen-activated protein kinase) -Weg (Nelms K et al., 1999). Diese Signalwege fördern das Zellwachstum und -überleben.

Gegenregulationsmechanismen

Über die Inaktivierung dieses Signalweges ist nur wenig bekannt. Folgende Proteine wurden als Gegenregulatoren identifiziert:

SHP-1: diese Tyrosinphosphatase ist mit der IL-4R-Kette assoziiert (Imani FB et al., 1997) und wirkt negativ regulatorisch auf den IL-4- und IL-13-induzierten JAK-STAT-Signalweg (Haque SJ et al., 1998).

SHIP: eine Inositol-5-phosphatase, die negativ auf den PI3-Kinase-Signalweg wirkt, indem sie die Enzymprodukte der PI3K dephosphoryliert. SHIP wird durch IL-4-induzierte Phosphorylierung aktiviert (Zamorano J et al., 1998).

FRIP: dieses „*Interleukin-Four-Receptor Interacting Protein*“ interagiert mit dem IL-4R-Motiv der IL-4R-Kette (Nelms K et al., 1998).

SOCS: Proteine der „*suppressor of cytokine signaling*“-Familie hemmen JAKs (Nicholson SE et al., 1998) und reduzieren die Aktivierung von STAT6 und die CD23-Expression (Losman JA et al., 1999).

1.4 *Single-nucleotide-polymorphisms* im IL4R-Gen

Nach Entdeckung der ersten Punktmutationen (*single-nucleotide-polymorphisms* = SNPs) im kodierenden Teil von IL4R im Jahr 1997 (Deichmann K et al., 1997. Hershey GK et al., 1997) werden heute insgesamt sechzehn SNPs in der kodierenden Region beschrieben (Kruse S et al., 1999b. Ober C et al., 2000a. Wu X et al., 2001). Von diesen sechzehn SNPs führen zehn zu einem Aminosäureaustausch, sind also nicht-synonyme SNPs. Im dem Abschnitt des IL4R-Gens, welcher für den intrazellulären Teil des IL-4R-Proteins kodiert, befinden sich neun nicht-synonyme Varianten, in dem Abschnitt für den extrazellulären Teil eine nicht-synonyme Variante (I50V). Zwei weitere SNPs (T-890C, T-1914C) und ein *short-tandem-repeat* [(CAAAA)₅₋₇ 3600] konnten in der 5'-Promoterregion von IL4R nachgewiesen werden (Hackstein H et al., 2001). Im nicht-kodierenden Bereich wurden ebenfalls zahlreiche SNPs identifiziert (OMIM; MIM 147781).

Die Nomenklatur der SNPs richtet sich nach den Empfehlungen der *Nomenclature Working Group* (Antonarakis SE, 1998), nach denen für Polymorphismen mit Aminosäureaustausch der AS-Einzelbuchstabencode verwendet wurde. Die Wildtyp-Aminosäure befindet sich vor der Kodonnummer, die mutierte Aminosäure dahinter, wobei sich die Kodonnummern auf die

cDNA des reifen Proteins beziehen. Die IL-4R-Sequenz von Idzerda RL et al. (1990) gilt als Wildtyp und Abweichungen davon als Mutationen.

Die Tabelle 1 zeigt SNPs im kodierenden Teil des IL4R-Gens mit der jeweiligen cDNA-Position, der Wildtyp- und Mutationssequenz und der Allelfrequenz (OMIM; MIM 147781).

Tab. 1: SNPs im kodierenden Teil des IL4R-Gens

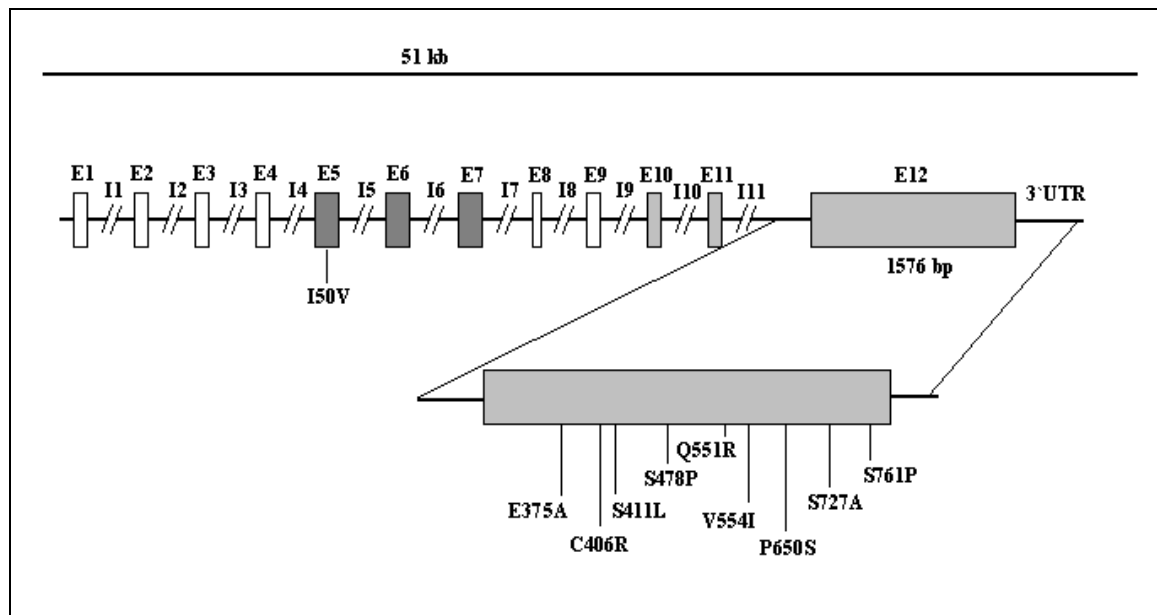
cDNA-Position	Wildtyp-Sequenz	Mutations-Sequenz	SNPs	Allelfrequenzen (in %)			
398	ATC	GTC	I50V	I50	47,6	V50	52,4
676	AAC	AAT	C/T	C	k.A.	T	k.A.
997	CTC	CTG	C/G	C	k.A.	G	k.A.
1374	GAG	GCG	E375A	E375	76,6	A375	23,4
1417	CTG	CTT	G/T	G	76,8	T	23,2
1466	TGC	CGC	C406R	C406	89,8	R406	10,2
1468	TGC	TGT	C/T	C	94,8	T	5,2
1474	CTT	CTC	T/C	T	72,7	C	27,3
1482	TCG	TTG	S411L	S411	96,0	L411	4,0
1682	TCC	CCC	S478P	S478	73,9	P478	26,1
1902	CAG	CGG	Q551R	Q551	71,6	R551	28,4
1910	GTA	ATA	V554I	V554	97,3	I554	2,4
2198	CCA	TCA	P650S	P650	99,6	S650	0,4
2429	TCC	GCC	S727A	S727	88,0	A727	12,0
2531	TCA	CCA	S761P	S761	97,8	P761	2,2
2572	CCT	CCC	T/C	T	96,4	C	3,6

fett gedruckt: nicht-synonyme SNPs
k.A.: keine Angaben

Die genomische Struktur des IL4R-Gens inklusive der nicht-synonymen SNPs illustriert Abbildung 3 (modifiziert nach Wu X et al., 2001). IL-4R wird von insgesamt 12 Exons kodiert. Die einzige nicht-synonyme Variante außerhalb von Exon 12 ist I50V im Exon 5.

Das translatierte IL-4R-Protein beinhaltet ein Signalpeptid (Exon 3- 4), eine extrazelluläre Domäne (Exon 5- 7), eine transmembranäre Domäne (Exon 9) und eine intrazelluläre Domäne (Exon 10-12). Exon 1 und 2 sind nicht translatierte Exons, Exon 8 ist nur in der löslichen, durch alternatives *Splicing* entstandenen, Form enthalten (Kruse S et al., 1999a)

Abb. 3: Genomische Struktur des IL4R-Gens mit nicht-synonymen SNPs (modifiziert nach Wu X et al., 2001)



1.5 IL-4 in der Pathogenese der Atopie

Der allergische Phänotyp ist das Resultat einer komplexen Interaktion zwischen genetischer Prädisposition und Exposition zu Umweltfaktoren. (Barnes KC, Marsh DG, 1998. Cookson WOCM, 1996). Die Prävalenz von atopischen Erkrankungen zeigt weltweit Differenzen (The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) steering committee, 1998). Allergien sind vor allem in den westlichen Industrieländern mit einer Prävalenz von bis zu 40% auf dem Vormarsch (Cline MG, Burrows B, 1989. Von Mutius E et al., 1994. Shirakawa T et al., 1997). Als mögliche Ursachen werden Umweltfaktoren des westlichen Lebensstils diskutiert. Im Vordergrund steht dabei die mangelnde Auseinandersetzung des kindlichen Immunsystems mit Umweltkeimen, v.a. parasitärer Art (Strachan DP, 1989. Romagnani S, 1994. Cookson W, 1999). Neben der Einschränkung der Lebensqualität besteht auch ein spürbarer Kostendruck auf das Gesundheitswesen. So verursachen vier Millionen Asthmapatienten in Deutschland etwa 10 Milliarden Euro Kosten jährlich (Kutter S, 1999). Die hereditäre Prädisposition wurde im Jahr 1923 von den amerikanischen Forschern Cooke und Coca als „Atopie“ bezeichnet. Zum atopischen Formenkreis gehören u.a. allergisches Asthma bronchiale, allergische Rhinokonjunktivitis und atopische Dermatitis. Nach Coombs und Gell werden vier Typen immunpathologischer Reaktionen beschrieben. Bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I reagiert nach Zweitkontakt das Allergen mit antigenspezifischen IgE-Antikörpern auf Mastzellen und Basophilen, die bevorzugt an

Blutgefäßen unter Schleimhäuten eingelagert sind. Durch Kreuzvernetzung der hochaffinen IgE-Rezeptoren (FcεI) werden die Zellen degranuliert und setzen chemische Mediatoren frei (Histamin, Leukotriene, Prostaglandine, u.a.), die zu den typischen allergischen Symptomen (Pruritus, Ödembildung, Bronchospasmus, Vasodilatation) bis hin zum anaphylaktischen Schock führen.

Zahlreiche Untersuchungen bestätigen, dass IL-4 in der Pathogenese der Atopie eine Schlüsselrolle spielt (Casolaro V et al., 1996. Wierenga EA et al., 1999. Kimura M et al., 2000. Gosset P et al., 2001). Bei atopischen Erkrankungen erwerben allergenspezifische T-Zellen den Th2-Phänotyp und produzieren Zytokine, die für den Wechsel der Immunglobulinklassen zu IgE in B-Lymphozyten verantwortlich sind und eine Eosinophilie induzieren. Diese kann bei chronischem Verlauf auch zu einer dauerhaften Gewebeschädigung führen (Schleimer RP et al., 1992. Moser R et al., 1992). Dass IL-4 ein wesentlicher Faktor für die Entwicklung von Th2-Zellen ist, zeigen z.B. Versuche mit neutralisierenden Anti-IL-4-Antikörpern (Sadick MD et al., 1990. Romani L et al., 1992), mit löslichem IL-4-Rezeptor (Gessner A et al., 1994. Puccetti P et al., 1994) und Versuche mit IL-4-gendefizienten Mäusen in zahlreichen Infektionsmodellen (Kopf M et al., 1993). Bei IL-4-/- Mäusen zeigte sich, dass diese nicht fähig sind, Th2-Zellen zu bilden und folglich auch kein spezifisches IgE synthetisieren (Kopf M et al., 1993).

Bei Atopikern findet man vermehrt IL-4-produzierende T-Helferzellen und IgE-Antikörper im Blut (Abbas AK et al., 1996). Untersuchungen menschlicher T-Zell-Klone von Patienten mit Hyper-IgE-Syndrom und atopischen Erkrankungen haben gezeigt, dass v.a. ein Ungleichgewicht zwischen diesen Subpopulationen für die Überproduktion von IgE-Antikörpern verantwortlich ist (Maggi E et al., 1991. Romagnani S, 1990). Bereits 1988 konnten del Prete G et al. zeigen, dass Atopiker im Vergleich zu gesunden Personen signifikant mehr zirkulierende T-Zellen besitzen, die zur IL-4-Synthese fähig sind. Untersuchungen zeigen auch, dass der Prozentsatz von CD4⁺ T-Zellen und IL-4 im Blut von Allergikern im Laufe der Therapie absinkt (Corrigan CJ et al., 1988. Secrist H et al., 1993).

1.6 Genetische Untersuchungen zur Atopie

Epidemiologische Studien zeigen eine familiäre und geographische Häufung atopischer Erkrankungen. Die Wahrscheinlichkeit, Asthma zu entwickeln, beträgt für Kinder mit einem asthmatischen Elternteil ca. 25%, bei zwei asthmatischen Elternteilen ca. 50% (Neddenriep D et al., 1989). Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht für Kinder, deren Mütter selbst atopisch sind (Moffat MF, Cookson WOCM, 1998. Cookson WOMC et al., 1992. Daniels SE et al.,

1996). Die Konkordanzrate von Atopie und IgE-Werten bei eineiigen Zwillingen ist höher als bei zweieiigen (Marsh DG et al., 1981. Sandford A et al., 1996). Bezüglich der Vererbungsmodi von Atopie und IgE-Werten existieren dominante, rezessive, kodominante und polygene Modelle (Gerrard JW et al., 1978. Borecki IB et al., 1985. Dizier MH et al., 1995).

1.6.1. Genomweite Kopplungsanalysen

Zur Identifizierung von Suszeptibilitätsgenen für Atopie wurden zahlreiche genomweite Kopplungsanalysen in ethnisch differenten Populationen durchgeführt. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick genomweiter Kopplungsanalysen. Kopplungen zeigten sich v.a. mit den chromosomalen Regionen 5q31, 6p21, 11q13, 12q, 14q und 16p.

Tab. 2: Übersicht genomweiter Kopplungsanalysen zur Atopie

Chromosom	Population	Autor
11q13	Australier, Kuwaities	Moffatt MF, Cookson WOMC, 1997
	Afrikaner	Thomas NS, Holgate ST, 1998
	Briten	Daniels SE et al., 1996
	Japaner	Shirakawa T et al., 1994
12q	Afro-Kariben, Amisch	Barnes KC et al., 1996
	Briten	Thomas NS et al., 1997
	Italiener	Malerba G et al., 2000
14q	Briten, Australier	Moffatt MF et al., 1994
5q31	Amisch	Marsh DG et al., 1994
16p12	Deutsche	Deichmann KA et al., 1998
4q, 6, 7, 11q, 13q, 16	Briten	Daniels SE et al., 1996
2q, 5q, 6p, 11p, 12q, 13q, 14q, 17p, 19q, 21q	Kaukasier, Afroamerikaner, Spanier	CSGA, 1997
3p, 5q, 12q, 19q, 21q	Hutterites	Ober C et al, 1998
1, 6,16	Hutterites	Ober C et al., 1999
2, 6, 9, 12	Deutsche	Wjst M et al., 1999
5, 6p, 8p, 9p, 14q, 16q, 16p12,19	Hutterites	Ober C et al., 2000b
19	Italiener	Venanzi S et al., 2001
7p	Finnen	Laitinen T et al., 2001
1p36, 3q21-q22, 5q31, 6p24-p22	Dänen	Haagerup A et al., 2002
14q24	Isländer	Hakonarson H, et al., 2002
2q, 6p, 7q, 13q	Holländer	Koppelman GH et al., 2002
1p, 5q31, 6p, 8p, 11q, 12q, 15q	Amerikaner	Xu X et al., 2002

Eine Kandidatenregion ist der Zytokingencluster auf Chromosom 5q (Gene für: IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12 β , IL-13, GM-CSF, β_2 -adrenergen Rezeptor). Die Kopplung von Gesamt-IgE- Werten zum IL-4-Gen (Marsh DG et al, 1994) zeigte sich auch in anderen Studien (Meyers DA et al., 1994. Postma DS et al., 1995. Doull IJ et al., 1996). Eine Metaanalyse aus

acht Studien (n= 5424) konnte die Kopplung zum Chromosom 5q dagegen nicht bestätigen (Jacobs KB et al., 2001).

Das Gen für FcεRI auf Chromosom 11q bleibt trotz widersprüchlicher Ergebnisse aufgrund der Beteiligung von FcεRI an der Histaminfreisetzung eines der wichtigsten Kandidatengene. Ebenfalls interessant sind die Kandidatengene auf Chromosom 12q (Gene für: IFN-γ, *Mast cell growth factor* -MGF, Leukotrien A4 Hydrolase- LTA4H, Thyroidrezeptor 2- TR2, *signal transducer and activator of transcription 6*- STAT6, *Insuline-like growth factor-1*- IGF-1 und *nitric oxide synthase*- NOS1). Weitere Kandidatengene sind die MHC-Klasse II-Gene auf Chromosom 6p (Young RP et al., 1994) und die T-Zell-Rezeptorgene α/δ (TCR- α/δ) auf Chromosom 14q (Moffatt MF et al., 1994).

Die Kopplungsanalyse von Deichmann KA et al. (1998) zeigte in einer deutschen Population eine Kopplung zwischen Atopie und der Region 16p12, wobei die mütterlichen Allele besonders häufig vertreten waren. Der prominenteste Kandidat in dieser chromosomalen Region ist IL4R. Eine Kopplung zwischen Chromosom 16 und Atopie zeigte sich bereits in der Oxford-Studie von 1996 (Daniels SE et al., 1996), der ersten genomweiten Kopplungsanalyse zur Identifizierung von Atopie-Genen. Bestätigt wurde diese Kopplung in weiteren genomweiten Kopplungsanalysen bei den Hutterites, einer kaukasischen Gründerpopulation in Kanada (Ober C et al., 1999, 2000a). In einer japanischen Population konnte dagegen keine Kopplung zwischen Atopie und IL4R nachgewiesen werden (Noguchi E et al., 1999a). Ebenfalls keine Kopplung zwischen Atopie und IL4R ergab eine Studie in einer italienischen Population (Patuzzo C et al., 2000).

1.7 IL4R: Genetische Assoziationsstudien

Die Resequenzierung des IL4R-Gens zeigte zahlreiche Punktmutationen (Deichmann K et al., 1997. Hershey GK et al., 1997. Kruse S et al., 1999b. Ober C et al., 2000. Hackstein H et al., 2001. Wu X et al., 2001). Daraufhin folgten zahlreiche genetische Assoziationsstudien, die in Tabelle 3 aufgezeigt werden. Einige IL4R- SNPs zeigen Assoziationen zu Atopie, Asthma und IgE-Werten (Übersicht in: Gessner A, Röllinghoff M, 2000. Shirakawa I et al., 2000), zur Nierentransplantatabstoßung (Hackstein H et al., 1999) und zum systemischen Lupus erythematodes (Kanemitsu S et al, 1999. Youn J et al., 2000). Insgesamt bleiben die Ergebnisse der genetischen Assoziationsstudien jedoch widersprüchlich.

Tab. 3: IL4R: Genetische Assoziationsstudien

SNPs	Phänotyp	Assoziation	Probanden	Population	Autor
R551	Hyper-IgE-Syndrom	ja	3	Amerikaner	Hershey GK et al., 1997
	Atopie	ja	20		
R551	Hyper-IgE-Syndrom	nein	20	Amerikaner	Grimbacher B et al., 1998
I50	Asthma	ja	240	Japaner	Mitsuyasu H et al., 1998
	IgE	ja			
R551	Asthma	nein	200	Japaner	Mitsuyasu H et al., 1999
R551	Atopie	nein	133	Singapurer	Tan EC et al., 1999a
R551	Atopie	nein	1083	Italiener	Malerba G et al., 1999
R551	Nierentransplantat-abstoßung	ja	203	Deutsche	Hackstein H et al., 1999
R551/ I50	System. Lupus erythematodes (SLE)	ja	50	Japaner	Kanemitsu S et al, 1999
	<i>Insulin dependent diabetes mellitus</i>	nein	54		
R551	<i>Minimal change nephropathy</i>	nein	149	Briten	Parry RG et al, 1999
R551/ P478	IgE	ja	181	Deutsche	Kruse S et al., 1999b
	Spez. Sensibilisierung	nein			
R551	Atopie	nein	361	Japaner	Noguchi E et al, 1999a
I50	Atopie	nein	375	Japaner	Noguchi E et al, 1999b
R551	Asthma	ja	149	Amerikaner	Rosa-Rosa L et al., 1999
I50	Atopie	nein	133	Singapurer	Tan EC et al., 1999b
R551	Asthma	nein	851	Italiener	Patuzzo C et al., 2000
I50	Asthma	ja	100	Japaner	Takabayashi A et al., 2000
R551		nein			
R551	Atopische Dermatitis	ja	27	Japaner	Oiso N et al., 2000
I50		nein			
E375		nein			
C406		nein			
R551	SLE	ja	155	Koreaner	Youn J et al., 2000
	Sjögren Syndrom	ja	45		
	System. Sklerodermie	ja	19		
	Rheumatoide Arthritis	nein	57		
R551	Atopie	nein	44	Polen	Rogala B et al., 2001
S761	Asthma	ja	196	Amerikaner	Andrews RP et al., 2001
I50 R551	Atopie	nein	424	Dänen	Haagerup A et al., 2001
		nein			
R551	Kutane Mastozytose	ja	36	Amerikaner	Daley T et al., 2001
I50	Atopische Dermatitis	nein	30	Mexikaner	Mujica-Lopez KI et al., 2002
E375		nein			
C406		nein			
E375	Gesamt- IgE	ja	200	Dänen	Howard TD et al, 2002
C406	Gesamt- IgE	ja			
S478	Gesamt- IgE, Asthma	ja			
I50	Gesamt- IgE	nein			
R551	Gesamt- IgE	nein			
I50	Asthma	nein	415	Deutsche	Wjst M et al, 2002
E375		nein		Schweden	
C406		nein			
S478		nein			
R551		nein			

1.8 IL-4 in der Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts von dem Neurologen Charcot beschrieben. Sie ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Autoimmunerkrankung, die zu variablen Symptomen wie vorübergehenden Sprach- und Gehstörungen über Parästhesien bis hin zu spastischen Lähmungen, zur Erblindung und zu einem kognitiven und mentalem Verfall führt (Tienari PJ, 1994. Langdon DW, Thompson AJ, 1996). Sie ist eine der häufigsten organischen Krankheiten des Nervensystems bei Nordeuropäern mit einem Prädilektionsalter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Sadovnick AD, Ebers GC, 1993). Frauen erkranken doppelt so häufig an MS als Männer (Duquette P et al., 1992). Die Erkrankungshäufigkeit zeigt ein deutliches Nord-Südgefälle mit Zunahme der Häufigkeit in Richtung Norden (Kurtzke JF, 1985).

Bei der MS unterscheidet man verschiedene Verlaufsformen (Lublin FD, Reingold SC, 1996) [Tab. 4].

Tab.4: Klinische Einteilung der Multiplen Sklerose (nach Lublin FD, Reingold SC, 1996)

Kategorie	Definition
<i>relapsing remitting</i> (RRMS)	Episoden akuter Verschlechterung mit nachfolgender Verbesserung, intermittierende Remissionen
<i>secondary progressive</i> (SPMS)	Graduelle neurologische Verschlechterung mit oder ohne akuten Schüben bei einem Patienten mit vorheriger RRMS
<i>primary progressive</i> (PPMS)	Graduelle kontinuierliche neurologische Verschlechterung seit Krankheitsbeginn
<i>progressive relapsing</i>	Graduelle neurologische Verschlechterung seit Symptombeginn mit gelegentlichen Schüben

Die häufigste Form (ca. 80% der Fälle) ist dabei schubweise remittierend (*relapsing remitting* MS, RRMS). Bei über der Hälfte der Erkrankten kommt es innerhalb von 10 Jahren zum Übergang in die sekundär progressive Verlaufsform (*secondary progressive* MS, SPMS). Seltener (10%) ist der primär progrediente Verlauf (*primary progressive* MS, PPMS), mit dem Kennzeichen der irreversiblen Lähmung. Diese Patienten sind bei Krankheitsbeginn älter (40.-60. Lebensjahr) und entwickeln eher eine progressive Myelopathie (Rudick RA et al., 1997). Eine sehr seltene Form ist die *progressive relapsing* MS.

Im Allgemeinen ist der Verlauf progredient und verursacht bei ca. 35% der Patienten im Laufe der ersten 15 Jahre nach Diagnosestellung erhebliche Behinderungen.

Die Erkrankung ist charakterisiert durch intrazerebrale Entmarkungsherde (Plaques) und gliöse Vernarbungen der weißen Substanz. Es kommt zu einer perivenösen Entzündungsreaktion mit Ödem und Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen (Martin R et al., 1992). Vieles deutet daraufhin, dass es sich bei der MS um ein heterogenes Krankheitsbild handelt, das verschiedene immunpathogenetische Subtypen beinhaltet (Lucchinetti CF et al., 1996). Für die destruierende Entzündung werden primär autoreaktive T-Lymphozyten verantwortlich gemacht (Hohlfeld R et al., 1995). Th1-Zellen setzen dabei proinflammatorische Zytokine frei, welche vor allem Makrophagen aktivieren aber auch B-Zellen und Mikrogliazellen (Olsson T, 1995. Rieckmann P et al., 1995). B-Zellen produzieren Autoantikörper, die durch Komplementaktivierung an der Gewebeschädigung mitwirken (Piddlesden SJ et al., 1993. Storch MK et al., 1998a). Als mögliche Antigene kommen v.a. Myelinproteine in Betracht wie MBP (*myelin basic protein*), PLP (*myelin proteolipid protein*), MAG (*myelin associated glykoprotein*), MOBP (*myelin oligodendrocyte basic protein*) und MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*). Aber auch nicht-myeline Proteine (Storch M, Lassmann H, 1997) und Nicht-Proteine wie Glykolipide (Shamshiev A et al., 1999) können eine Rolle spielen.

Für die Entstehung der MS werden mehrere Faktoren verantwortlich gemacht (Hogencamp WE et al., 1997). Bei genetisch veranlagter Hyperreaktivität des Immunsystems können Kontakte mit bestimmten Viren eine gesteigerte Immunreaktion und nach längerer Inkubationszeit eine Autoimmunreaktion zur Folge haben (Gran B et al., 1999). Infektionen mit Masern-, Röteln- oder Mumps-Viren im Alter zwischen 12 und 15 Jahren prädisponieren zu einem erhöhten Risiko (Waksman BH, 1989). Eine wichtige Rolle spielt auch die Immunitätslage des Organismus, denn oft gehen den Schüben Infektionen, besonders des oberen Respirationstraktes, voraus (Sibley WA et al, 1985). Trotzdem ist bis jetzt kein verursachendes Agens bei der MS isoliert worden.

Die bedeutende Rolle von IL-4 in der Pathogenese wird durch das Tiermodell der Experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE) deutlich (Zamvil SS, Steinman L, 1990), das dem humanen Krankheitsbild der Multiplen Sklerose (MS) ähnelt. In diesem Tiermodell wird die Zerstörung der Markscheiden wesentlich durch T-Helferzellen und Makrophagen vermittelt. Durch Transfer von T-Helferzell-Klonen, die IL-2 und IFN γ produzieren (Th1-Zellen), kann die EAE auf andere Tiere übertragen werden. Eine Immuntoleranz gegen EAE kann durch orale Gabe eines potentiellen Autoantigens (*myelin basic protein*; MBP) induziert werden. Im Gehirn dieser Tiere findet man nun keine Th1-Zellen mehr, sondern Th2-Zellen, die IL-4 und den transformierenden Wachstumsfaktor β

produzieren. Diese Zellen können eine gewebedestruierende Th1-vermittelte Immunantwort unterdrücken. Derart behandelte Mäuse erkrankten in der Regel nicht (Chen Y et al., 1994. Abbas AK et al., 1996). Die Rolle von IL-4 und Th2-Zellen bei der EAE scheint aber komplexer zu sein, da kürzlich eine EAE auch durch Th2-Zellen induziert werden konnte (Lafaille JJ et al., 1997). Der Verlauf der EAE wird zwar durch IL-4 gebessert (Racke MK et al., 1994. Shaw MK et al., 1997), jedoch ist die genaue Bedeutung von IL-4 bei der MS noch unbekannt.

Beim Menschen wird IL-4 als potentiell immuntherapeutikum bei der MS diskutiert, da es eine antiinflammatorische Th2-Antwort induzieren kann (Hohlfeld R, 1997). In experimentellen Tiermodellen zur Untersuchung der Pathogenese organspezifischer Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, juveniler Diabetes mellitus und Multiple Sklerose wird durch Induktion einer Th2-vermittelten Immunantwort mittels IL-4 eine Gewebeschädigung unterdrückt (Röcken M et al., 1996. Racke MK et al., 1994). Andererseits werden B-Lymphozyten durch IL-4 zur Antikörpersynthese angeregt. Eine abnormale humorale Immunreaktion bei MS-Patienten wurde ebenfalls beschrieben. Allerdings ist noch offen, ob diese humoralen Reaktionen direkt an der Pathogenese beteiligt sind oder ein Epiphänomen der Dysregulation des Immunsystems darstellen. Autoantikörper können zumindest bei bestimmten Subtypen der MS eine pathogenetische Rolle bei der Demyelinisierung spielen (Lucchinetti CF et al., 1996). Neuere Studien sprechen MOG-Autoantikörpern eine bedeutende Rolle zu (Genain CP et al., 1999. Raine CS et al., 1999). MOG wird nur im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und befindet sich auf der Oberfläche der Myelinscheiden (Bernard CC et al., 1997). EAE-Modelle mit Nagetieren und Primaten zeigen, dass MOG-Autoantikörper allein eine Myelindestruktion induzieren können (Genain CP et al., 1995. Storch MK et al., 1998b). In neueren Studien wurden in MS-Läsionen MOG-Autoantikörper an zerfallenen Myelinsegmenten vorgefunden (Genain CP et al., 1999). Des weiteren zeigte sich eine größere Zahl MOG-spezifischer T-Zellen bei MS-Patienten gegenüber Gesunden (Kerlero de Rosbo N et al., 1997. Wallström E et al., 1998).

In Remissionsphasen dominieren Th2-Zellen die Immunlage. Da diese Zellen unter IL-4-Einfluss generiert werden, wird diesem Zytokin eine bedeutende Rolle in den Remissionsphasen der MS zugeschrieben. Durch seine antiinflammatorische Wirkung unterdrückt IL-4 zusätzlich entzündungsassoziierte Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF α und induziert Proteine wie IL-1R α und IL-1-Rezeptor Typ II, die antagonistisch zu dem wichtigen Entzündungsmediator IL-1 wirken (Hart PH et al., 1988. Vannier E et al., 1992. Gautaman SC et al., 1992. Colotta et al., 1993. Bogdan C, Nathan C, 1993). Einige Studien

konnten bei MS-Patienten eine verminderte Prävalenz atopischer Erkrankungen nachweisen (Oro AS et al., 1996. Neukirch F et al., 1997). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine genetische Prädisposition zu Th1-vermittelten Erkrankungen vor der Entwicklung Th2-vermittelter Erkrankungen schützen kann.

1.8.1 Genetische Untersuchungen zur MS

Epidemiologische Studien zeigen eine familiäre und geographische Häufung der Multiplen Sklerose. In betroffenen Familien betragen die Konkordanzraten für Geschwister 1,9 %, für dizygote Zwillinge ca. 4% und für monozygote Zwillinge 25 - 30% (Ebers GC et al., 1986. Kinnunen E et al., 1987. Sadovnick AD et al., 1993. McFarland HF, 1993. Mumford CJ et al., 1994.). Familienstudien haben ebenfalls ein über 20-fach höheres Risiko bei Verwandten ersten Grades im Vergleich zur Normalbevölkerung (Sadovnick AD et al., 1988. Doolittle TH et al., 1990. Robertson CF et al., 1996a) nachgewiesen, wobei Töchter mit erkrankter Mutter das höchste Risiko tragen (Sadovnick AD et al., 1991). Diese genetische Prädisposition bei der MS unterstreichen ebenfalls zahlreiche Studien mit Zwillingen (Sadovnick AD et al., 1993. Mumford CJ et al., 1994), Adoptierten (Ebers GC et al., 1995), Halbgeschwistern (Sadovnick AD et al., 1996) und Ehepaaren (Robertson NP et al., 1997). Einflüsse durch Umweltfaktoren machen Migrationsstudien (Dean G et al., 1976) und Analysen von MS-Epidemien (Kurtzke JF, Hyllested K, 1979. Sheremata WA et al., 1985. Kurtzke JF et al., 1982) deutlich.

1.8.2 Kopplungs- und Assoziationsanalysen zur MS

Die bisher durchgeführten Kopplungs- und Assoziationsanalysen zeigten kein einheitliches Bild (Haines JL et al., 1996). Insgesamt liegen vier genomweite Kopplungsanalysen vor. Drei genomweite *Scans* von amerikanischen/französischen, englischen und kanadischen Multiplex-Familien wurden 1996 veröffentlicht (Haines JL et al., 1996. Sawcer S et al, 1996. Ebers GC et al, 1996). Diese und eine spätere finnische Studie (Kuokkanen S et al., 1997) ergaben eine signifikante Kopplung zum Chromosom 6p21 (MHC), welche die schon lange bekannte HLA-Assoziation bestätigt (Olerup O, Hillert J, 1991). Auf diesem Chromosom liegen die DRB1*- und DQB1*-Allele (Epplen C et al., 1997. Coraddu F et al., 1998).

Die Mehrzahl der Assoziationsstudien wurde in europäischen und nordamerikanischen Populationen durchgeführt. Die deutlichste Assoziation zeigte sich zum HLA-DR2-Haplotyp (Olerup O, Hillert J, 1991. Tiwari JL, Terasaki PI, 1985), wobei sich die HLA-Frequenzen bei

MS-Patienten in verschiedenen Populationen unterscheiden (Tienari PJ, 1994). Dieses Erkenntnis lässt auf weitere beteiligte Gene schließen. Eine Assoziation von HLA-DRB1*1501, DQA1*0102, DQB1*0602 mit MS wurde immer wieder bestätigt (Haines JL et al., 1998. Coraddu F et al., 1998). Diese HLA-Haplotypen finden sich aber nur bei MS-Patienten mit europäischer Abstammung (Kaukasier) gehäuft. In anderen ethnischen Populationen sind andere HLA-Allele mit MS assoziiert (Marrosu et al., 1998). Als gesichert kann nach dem heutigen Stand der Wissenschaft eine Assoziation zwischen HLA-Allelen und der MS angesehen werden.

1.8.3 IL4R und MS

Eine neuere Studie ergab eine Kopplung mit dem Marker D16S420 (43,2 cM), der u.a. IL4R flankiert (He B et al., 1998). Durch eine Stratifizierung in HLA-DR15-positive und -negative Familien konnten Chataway J et al. (1998) einen Kopplungshinweis zu 16p bei den HLA-DR15-negativen Familien finden. Die höchste Signifikanz zeigte sich bei den Markern D16S407 (16,7 cM) und D16S411 (57,8 cM). Das IL-4R-Gen liegt dem Mikrosatellitenmarker D16S3093 (50,8 cM) am nächsten (www.ensembl.org).

In der Studie von McDonnell GV et al. (2000) mit sechs immunologisch bedeutenden Zytokin- und Rezeptor-Genen (IL-1 α , IL-2, IL2R β , IL-4, IL-9, IL-10) konnte keine genetische Assoziation mit MS nachgewiesen werden.

1.9 Natürliche Varianten der IL-4R-Kette: Funktionelle Bedeutung für die Signaltransduktion

Zur Untersuchung des funktionellen Einflusses des Aminosäureaustausches auf die Signaltransduktion des IL-4-Rezeptors wurden mehrere *in vitro*- Expressionsstudien durchgeführt. Die Tabelle 5 gibt einen Überblick.

Tab. 5: *In vitro*-Expressionsstudien der IL4R-SNPs

SNPs	Studie	Ergebnisse	Autor
R551	CD-23 Expression	erhöht	Hershey GK et al., 1997
	SHP-1 Bindung	vermindert	
R551/ I50	STAT6- Aktivierung	I50: erhöht R551: kein Unterschied	Mitsuyasu H et al., 1999
	Transkriptionsaktivität des I ϵ Promoter	I50: erhöht 551: kein Unterschied	
	Bindungsaffinität von IL-4 zum IL4-R	I50: kein Unterschied R551: kein Unterschied	
	IL-4R α Expression auf der Zelloberfläche	I50: kein Unterschied R551: kein Unterschied	
R551	CD23 Expression	I50: erhöht	Wang HY et al., 1999
	IgE Synthese	I50: erhöht	
	STAT6- Aktivierung	R551: kein Unterschied	
	IRS-1 Aktivierung	R551: kein Unterschied	
R551/ P478	CD-23 Expression	R551: kein Unterschied	Kruse S et al., 1999b
	Phosphorylierung von IRS-1 und IRS-2	gesteigert	
R551	Th1/ Th2- Ratio	erniedrigt	Youn J et al., 2000
	CD23-Expression	erhöht	
S761	CD-23 Expression	kein Unterschied	Andrews RP et al., 2001
	STAT6- Aktivierung	kein Unterschied	
R551	CD-23 Expression	kein Unterschied	Risma KA et al., 2002
I50		kein Unterschied	
R551/V50	IL-4R α Expression	gesteigert	

1.10 Zielsetzung

Das Gen des Interleukin-4 Rezeptors (IL4R) besitzt eine Schlüsselrolle in der Entwicklung entzündlicher und atopischer Erkrankungen. Genomweite Kopplungsanalysen zeigen eine Kopplung zwischen Atopie/ Gesamt-IgE und der chromosomalen Region 16p12 mit dem Kandidatengen IL4R. Eine neuere Studie konnte eine Kopplung zwischen der Multiplen Sklerose und IL4R nachweisen. Heute sind über zwanzig SNPs im 51 kbp umfassenden IL4R-Gen identifiziert. Davon führen zehn SNPs zu einem Aminosäureaustausch im Interleukin-4-Rezeptor. Zahlreiche Assoziationsanalysen bei unterschiedlichen klinischen Phänotypen wurden durchgeführt. Assoziationen zwischen einzelnen IL4R-SNPs und dem atopischem Phänotyp zeigten sich in vielen Studien, jedoch bleiben die Ergebnisse kontrovers.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung folgender Hypothese:

Varianten des IL4R-Gens sind mit einer Fehlregulierung der adaptiven Immunantwort assoziiert.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Assoziationen zwischen atopischen Phänotypen und IL4R-SNPs. Dazu müssen zunächst SSP-PCR-Primersets für eine schnelle, einfache und zuverlässige Genotypisierung der IL4R-SNPs entwickelt werden. In dieser Arbeit soll erstmals eine systematische Haplotypkartierung des IL4R-Gens vorgenommen werden.

Im zweiten Teil wird die Rolle der IL4R-SNPs bei der Multiplen Sklerose (MS) untersucht. Zunächst sollen Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der IL4R-SNPs bei MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen ermittelt werden. Dann werden Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung zwischen den drei häufigsten klinischen MS-Formen untersucht. Des Weiteren soll die Bedeutung der IL4R-SNPs in der Produktion myelin-spezifischer Autoantikörper festgestellt werden.

Im dritten Teil soll der Einfluss von IL4R-SNPs auf die Rezeptorfunktion analysiert werden. Dazu soll die durchflußzytometrische Messung der IL-4-induzierten CD23-Expression auf B-Lymphozyten (als Marker für die Signalweiterleitung im IL-4 Rezeptor) dienen.

2. MATERIALIEN

Kulturmedien, Puffer und Lösungen:

50xTAE:

242 g Tris ad 1 Liter Aqua dest., 100 ml 0,5M-EDTA (pH 8,0), 30 min bei 37°C rühren, 57,1 ml Eisessig, pH-Wert 7,2. Bei Gebrauch 100 µl 0,5 M-EDTA dazu

Loading buffer:

4g Saccharose, 25 mg Bromphenolblau, ad 9 ml Aqua dest., aliquotieren in 900 µl-Portionen, bei -20°C einfrieren. Bei Gebrauch 100 µl 0,5M-EDTA dazu.

Blocking buffer:

9,55 g/l PBS, 2 g/l BSA, 2 g/l Tween 20, 2 g/l Milchpuder, 50 µl *antifoam*, 10 mg/l Bromphenolblau, 100 mg/l Thimerosal

ABTS:

1 mg/ml in 500 mg/l NaClO₄, 8,36 g/l Citronensäure, 10,68 g/l Na₂HPO₄

Kulturmedium:

RPMI 1640 mit 2 mmol/l L-Glutamin, 10% FKS, 50 mmol/ml β-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

1%iges Paraformaldehyd:

200 mg PFA, 20 ml PBS ohne Mg/Ca, 150µl 3M NaOH, bei 56°C 60 min lösen, abkühlen, pH 7,5

Reagenzien

ABTS	Boehringer Mannheim, Mannheim
Agarose NA Ficoll-Paque Research Grade	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Ampli Taq Gold DNA Sequencing Kit 10 x Taq buffer	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
β-Mercaptoethanol Fetales Kälberserum Penicillin-Streptomycin RPMI 1640	Gibco BRL Life Technologies, Gaithersburg, USA
dNTPs	Pharmacia Biotech, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt

Isopropanol	
Ethansäure	
Natriumhydroxid	
Natrium-Acetat pH4,6	
Paraformaldehyd	
100 bp DNA ladder	New England BioLabs, Inc. Frankfurt
Ethanol	Riedel-de Haen AG, Seelze
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan	
PBS	PAA Laboratories, Cinz, Österreich
Puregene DNA Isolation Kit	Gentra Systems Inc., Minneapolis, USA
Pharmacia Cap System™ IgE FEIA, SX1-RIA und FEIA	Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Uppsala, Schweden

Verbrauchsmaterial

Blue Cap 15ml/50ml Serum-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
EDTA- Monovetten Lithium-Heparin-Monovette Reagenzröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalpipetten FACS-Röhrchen 24-Well-Platte	Becton Dickinson, USA
Genetic Analyzer Sample Tubes	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Glaswaren	Braun, Melsungen
PCR-Reaktionsgefäße Sunnyvale, USA	Robbins Scientific Corporation,
Pasteurpipetten Pastettes	neoLab, Deutschland
Pipetten Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen USA	Molecular BioProducts, Inc., San Diego,

Geräte

Alublock IKAMAG RET Vortexer MS2 Minishaker	Janke &Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen
Bunsenbrenner Biofuge A Brutschrank HERA Cell Sterilwerkbank	Heraeus, Hamburg
Digital video documentation for gels	Intas, Göttingen
Durchflußzytometer FacsCalibur	Becton Dickinson, USA
Elektrophoresegerät Consort E 863	Biometra, Deutschland
Elektrophoresekammer	von Keutz, Reiskirchen
Laborwaage PJ 6000	Mettler-Toled GmbH, Gießen
Mikroskop Leitz Diaplan	Leitz, Wetzlar
Mikrowelle	Siemens, München
pH-Meter pHM 61	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Thermal Cycler Gene Amp 9600 Sequenzer ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Spektralphotometer Spekol UV VIS	Zeiss, Jena
Sysmex F820	Medical Electronics, Deutschland
Transilluminator	IBI Kodak, Deutschland
Vakuum Pumpe VacuGene Pump Heidelberg	Pharmacia LKB Biotechnology,
Oligonukleotide, Antikörper, Zytokine	
IL4RA Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
HLA-DRB1*15-Primer	TIB Molbiol, Berlin
Mouse IgG1-FITC CD23-FITC CD19-PE CD4-FITC CD8-PE	Immunotech-Coulter, Marseille, Frankreich
Interleukin-4	Boehringer, Mannheim

Computerprogramme

CELLQuest

Becton Dickinson, USA

Oligo, Version 4.0

Med Probe, Oslo, Norwegen

SPSS^R Version 8.0

SPSS Inc. Chicago, IL, USA

GraphPad PRISMTM 2.0c

GraphPad, San Diego, CA, USA

Arlequin, Version 1.1

Genf, Schweiz

MS Power Point

Microsoft, USA

Windows Office

3. METHODEN

3.1 Patienten und Probanden

3.1.1 Gruppe der Atopiker und Kontrollpersonen

Das Untersuchungsmaterial stammte von insgesamt 158 freiwilligen Erstblutspendern des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Probanden wurden über Inhalt, Vorgehensweise und Untersuchungsziel der Studie ausführlich aufgeklärt und nach deren Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen.

Als Ausschlusskriterien für diese Studie galten:

1. eine vorangegangene Desensibilisierungstherapie und
2. eine Verwandtschaft ersten Grades innerhalb der Probandengruppe.

Das Geschlechterverhältnis in der Gruppe der Erstblutspender verhielt sich Frauen zu Männer 0,9:1 (74 Frauen, 84 Männer). Anamnestische und laborchemische Kriterien dienten zur Bestimmung des atopischen Phänotyps (Zetterstrom et al., 1981. Eriksson NE, 1990). Die Atopieanamnese erfolgte unter ärztlicher Anleitung mit standardisiertem Fragebogen (siehe Anhang 9.1). Atopie wurde auf der Basis erhöhter Gesamt-IgE-Werte ($\text{IgE} > 100\text{kU/l}$) oder eines positiven spezifischen IgE-Tests gegen die häufigsten Inhalationsallergene definiert.

3.1.2 Gruppe der Multiple Sklerose-Kranken

Die DNA der Patienten wurde uns freundlicherweise in Kooperation mit den neurologischen Universitätskliniken Göttingen (Wissenschaftlicher Leiter: Prof. Dr. med. Sigrid Poser, Wissenschaftliche Mitarbeiter: PD Dr. med. Andreas Bitsch, Dr. med. Frank Weber) und Würzburg (Wissenschaftlicher Leiter: Prof. Dr. med. Peter Rieckmann, Wissenschaftlicher Mitarbeiter: Dr. med. Matthias Mäurer) zur Verfügung gestellt. Diese Gruppe umfasste, nach vorangegangener Aufklärung und Einwilligung der Patienten in die Untersuchung, insgesamt 341 MS-Patienten. Das Verhältnis Frauen zu Männern betrug 2 : 1 (226 Frauen, 115 Männer). Die Diagnose der Patienten wurde nach klinischen und labortechnischen Kriterien gestellt (Poser CM et al., 1983. McDonnell GV, Hawkins SA, 1997). Die neurologische Beeinträchtigung wurde mittels der Kurtzke *Expanded Disability Status Scale* bestimmt (EDSS; Kurtzke JF, 1983). Der Krankheitsverlauf der Gruppe war heterogen (Tab.6) und umfaßt die primär progressive MS (PPMS; n=48), die schubweise remittierende MS

(*relapsing remitting* MS, RRMS; n=182) und die sekundär progressive MS (SPMS; n=102). Die Einteilung in diese Gruppen erfolgte nach der allgemeinen Definition der Subgruppen von MS durch Lublin FD und Reingold SC, 1996. Neun Patienten konnten keiner dieser Subgruppen zugeordnet werden, davon hatten vier Patienten Schübe nach einem primär progressivem Beginn (*progressive relapsing*), vier hatten initial einen Schub und danach einen chronisch progressiven Verlauf ohne weitere Schübe (*relapsing progressive*) und ein Patient zeigte einen monophasischen Krankheitsverlauf. Somit standen insgesamt 332 MS-Patienten für die weiteren Analysen zur Verfügung.

Um ein Maß für die Krankheitsschwere zu bekommen wurde eine Progressionsrate (PR) berechnet. Diese ergab sich aus dem Quotienten des EDSS-Wertes und der Krankheitsdauer. Die PR-Werte aller Patienten ergaben einem Mittelwert von 0,63 (RRMS 0,65; SPMS 0,49 und PPMS 0,79). Die ersten Krankheitssymptome wurden im Durchschnitt mit 29,9 Jahren (8-55 Jahren) festgestellt. Die Gruppe der PPMS-Patienten zeigte einen späteren Krankheitsbeginn (im Mittel 39,7 Jahre), als die RRMS-Patienten (im Mittel 27,4 Jahre) und die SPMS-Patienten (im Mittel 29 Jahre). Somit unterscheiden sich die Patienten hinsichtlich des Alters beim Krankheitsbeginn und der PR ($p < 0,001$ bzw. $p = 0,003$, Kruskal-Wallis-Test).

Tab. 6: Zusammensetzung der Multiple Sklerose-Patienten

	Gesamt	RRMS	SPMS	PPMS
Anzahl der Patienten	341	182	102	48
Alter bei Krankheitsbeginn ^b	29,9	27,4	29	39,7
Krankheitsdauer in Jahren ^b	10,4	7,52	16,14	8,54
Progressionsrate ^b	0,63	0,65	0,49	0,79

^b Ergebnisse als Mittelwerte

Da bei der PPMS immungenetische und klinische Unterschiede im Vergleich zu den anderen Subgruppen bestehen (Olerup O et al., 1989. Thompson AJ et al., 1997) und die SPMS als *long-outcome* der RRMS gesehen werden kann (Lublin FD, Reingold SC, 1996), wurden weitere Assoziationsanalysen mit PPMS und RR/SPMS als Subgruppen durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten 305 gesunde, nichtverwandte Erstblutspender des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus- Liebig-Universität Gießen, die

ebenfalls ausführlich über die Untersuchung aufgeklärt wurden. Das Geschlechterverhältnis verhielt sich Frauen zu Männer 0,8:1 (139 Frauen, 166 Männer).

3.2 DNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Allen Probanden wurden 3 ml EDTA- Blut entnommen. Die DNA der peripheren Blutleukozyten wurde mittels *Puregene DNA isolation kit* nach Herstelleranleitung gewonnen. Die Freilegung der DNA erfolgt durch Zelllysierung mit anionische Detergentien. DNase-Hemmstoffe schützen vor Verdauung. Die zu entfernende RNA wird durch RNAsen gespalten, die Proteine durch Salzfällung von der DNA getrennt. Nach Alkoholpräzipitation ist die DNA bei 4°C lagerfähig.

Die Konzentrationsbestimmung der in Aqua dest. gelösten DNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm (OD₂₆₀ bzw. OD₂₈₀) im UV-Spektralphotometer. Der bei 260 nm gemessene Wert entspricht dem Extinktionsmaximum der enthaltenen Nukleinsäuren, der bei 280 nm gemessene Wert dem der verunreinigenden Proteine. Durch Multiplikation des OD-Wertes bei 260 nm mit der Zahl 50 wird die Nukleinsäurekonzentration in µg/ml für Doppelstrang-DNA ermittelt (1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml). Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ gibt die Verunreinigung der Probe an. Ein Wert kleiner als 1,8 ist ein Indiz für eine übermäßige Verunreinigung mit Proteinen. Die Proben wurden schließlich mit Aqua dest. auf einen Wert von 10 ng /µl DNA eingestellt.

3.3 Nomenklatur der IL4R-Polymorphismen

Gemäß der Empfehlung der *Nomenclature Working Group* (Antonarakis SE, 1998) wurde der Aminosäure (AS)-Einzelbuchstabencode für alle nicht-synonymen Polymorphismen gewählt. Aus historischen Gründen korrespondiert die Nummer der AS-Polymorphismen in einigen Veröffentlichungen mit dem Vorläuferprotein der IL-4R α -Kette und in anderen mit dem reifen Protein (CD124). Zur Standardisierung der Nomenklatur wurde die Nummerierung auf das reife IL-4R α -Protein bezogen. Die IL-4R α -Sequenz von Idzerda RL et al. (1990) wurde als Wildtyp definiert und Abweichungen als Mutationen. Die Bezeichnung Haplotyp wurde benutzt, um eine Gruppe von IL-4R-SNPs zu beschreiben, die sich in der gleichen chromosomalen Phase befinden.

3.4 Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotide, die als Primer für die DNA-Polymerase dienen, beeinflussen in großem Maße den Erfolg einer PCR. Bei der *sequence specific priming*-PCR (SSP-PCR) ist das Design der Primer Grundvoraussetzung, um eine allelspezifische Amplifikation zu ermöglichen. Beim Entwurf der Primer sollten einige Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

- Länge der Primer zw. 14 - 30 Basen
- Basenzusammensetzung der Primer (G + C- Gehalt zw. 40 - 75%)
- Sequenzen mit signifikanter Sekundärstruktur sind zu vermeiden
- komplementäre Bereiche zw. den Primern eines Mixes am 3'-Ende sind zu vermeiden (Ausbildung von Primer-Dimeren)

Ein wesentlicher Aspekt beim Design ist die Schmelztemperatur (T_m) der Primer, bei der diese denaturieren, d.h. sich von der komplementären Sequenz des Einzelstranges lösen. Die Schmelztemperatur sollte nur wenige Grad über der *Annealing*-Temperatur liegen, damit eine spezifische Amplifikation stattfindet (je höher die *Annealing*-Temperatur, desto spezifischer wird die Reaktion). Durch Erniedrigung der *Annealing*-Temperatur wird die Ausbeute zwar größer, da die Primeranlagerung erleichtert ist, die Amplifikation wird aber unspezifischer. Beim Entwurf der Primer ist zu Beginn der Experimente die Länge der Primer an der Schmelztemperatur orientiert worden. Die Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide sollte 6-8 °C über der Annealingtemperatur liegen. Sie wurde nach der sog. „Wallace-Formel“, bestimmt, die jedoch nur eine Approximation darstellt:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^{\circ}\text{C} \times (\text{C}+\text{G})$$

Die Wahl der Primersequenzen beruht auf Publikationen über die Sequenzen der IL-4R-Polymorphismen (Idzerda RL et al., 1990; Deichmann K et al., 1997; Kruse S et al., 1999). Informationen über die Intronsequenzen im IL4R-Gen wurden der Genbank (Association No. AC004525) entnommen. Für die Bestimmung der Schmelztemperaturen, Sekundärstrukturen und möglicher Primer-Dimere der verwendeten Oligonukleotide wurde das Computerprogramm Oligo verwendet (Rychlik, Rhoads, 1989).

Tab. 7: Parameter der sequenzspezifischen Primer der SSP-PCR

SNP	Primer ^a	Sequenz von 5' - 3'	Produktlänge (bp)
I50V	Ile50-up	CTG CAG AGC CCA CAC GTG TA	150
	Val50-up	TGC AGA GCC CAC ACG TGT G	149
	50-common-do	CTG GGC TTG AAG GAG CCC TTC	
E375A	Glu375-up	ACT TCC AGG AGG GAA GGG A	176
	Ala375-up	ACT TCC AGG AGG GAA GGG C	
	375-common-do	CCC TGC ACT TGG GAA CTC AT	
C406R	Cys406-up	CAG GAC ATG GGG GAG TCA	177
	Arg406-up	AGG ACA TGG GGG AGT CAC	
	406-common-do	AGT CAG GTT GTC TGG ACT CTG	
S411L	Ser411-do	TGA GCA CTC GTA CTT CCC G	248
	Leu411-do	TGA GCA CTC GTA CTT CCC A	
	411-common-up	CGA TGT GTG GAG TTG TTT GAG	
S478P	Ser478-up	TTA CCG CAG CTT CAG CAA CT	163
	Pro478-up	TAC CGC AGC TTC AGC AAC C	162
	478-commom-do	CCA GGT TTC TGG CTC AGG TT	
Q551R	Gln551-lo	CAC CGC ATG TAC AAA CTC CT	143
	Arg551-lo	CAC CGC ATG TAC AAA CTC CC	
	551-common-up	AGC TCT CTG AGC CAA CCA C	
S761P	Ser761-do	ATG AGG ATT TAC TCT TCT CTG A	139
	Pro761-do	ATG AGG ATT TAC TCT TCT CTG G	
	761-common-up	TGC TGT GGA GAC AGG TCC T	
CRP	CRP-up	CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG	440
		GCC AGA CAG	
	CRP-do	GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT	
		AGA AGT GGA	

^a up = upstream primer; do = downstream primer

3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) besteht aus der exponentiellen Amplifikation von DNA, die mittels eines Enzyms und Oligonukleotiden in einem Zyklus mit drei Temperaturschritten abläuft:

1. Denaturierung der Doppelstrang-DNA

(Auftrennen der Doppelstrang-DNA bei 95°C in Einzelstränge)

2. Primer Anlagerung („*Annealing*„)

(Anlagerung der *upstream* und *downstream* Primer an den jeweils komplementären DNA-Einzelstrang. Diese dienen als Start-Moleküle für die DNA-Synthese)

3. Primer *Extension*

(Die komplementären Nukleotide werden ausgehend von den Primern mittels DNA-Polymerase bei 72 °C entlang des Einzelstrangs in 5`-3`-Richtung hinzugefügt.

Die DNA-Polymerase stammt aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermus aquaticus*, hat ein Temperaturoptimum von 72°C und bleibt auch kurze Zeit bei Temperaturen bis zu 95°C stabil. Nach jedem Zyklus kommt es zu einer selektiven Verdopplung der von den Primern flankierten DNA-Fragmente. In der Praxis kann nach ca. 30-35 Zyklen eine 10⁶ bis 10⁷-fache Amplifikation erreicht werden.

3.5.1 PCR mit sequenzspezifischen Primern

Die Genotypisierung der IL-4R-SNPs erfolgte anhand eines SSP-PCR Protokolls von Bein G et al. (1997) mit kleineren Modifikationen. Ein PCR-Ansatz (20µl) enthält 50 ng genomische DNA, 1x Taq *buffer*, 0,2 mmol/l dNTPs, 0,1 -0,2 µmol/l von jedem CRP-Kontrollprimer (bei der Variante Q551R je 0,2 µmol/l der CRP-*Primer*, bei den Varianten S478P und E375A je 0,05 µmol/l, bei allen anderen IL4R-SNPs je 0,1 µmol/l der CRP-*Primer*), 0,5-1 µmol/l von jedem IL4R spezifischem *Primer* (bei den Varianten I50V, E375A und S478P je 1 µmol/l, bei allen anderen IL4R-SNPs je 0,5 µmol/l) und 0,5U AmpliTaq Gold (eine modifizierte thermostabile Polymerase). Die MgCl₂-Konzentration betrug 1,5 mmol/l.

Zu jedem PCR-Experiment und Primer-Set wurde eine durch Sequenzierung validierte, positive und negative Kontrolle mitgeführt. Als Kontrollprimer dienen CRP-*Primer*, die an einer Region hybridisieren (Gen des C-reaktiven-Proteins), die keinen bekannten Polymorphismus aufweist. Dadurch kommt es zu einer Amplifikation eines Kontroll-DNA-Fragmentes mit einer Länge von 440 bp (allelspezifische Amplifikate: 139 - 248). Dieses Fragment erscheint immer dann, wenn die spezifischen Primer keine Zielsequenz gefunden

haben. Somit lässt sich nachweisen, dass optimale Reaktionsbedingungen und eine ausreichende Menge an DNA für die spezifischen Primer vorgelegen haben. Wenn eine spezifische Amplifikation stattfindet, ist das Kontrollfragment wesentlich schwächer als das allelspezifische Fragment oder überhaupt nicht nachweisbar.

Tab. 8: *Thermo-Cycle*-Programm der SSP-PCR

	95 °C - 10 min	Denaturierung der DNA
10 Zyklen	95 °C - 30 sec	Denaturierung
	65 °C - 60 sec	kombiniertes <i>Annealing</i> + <i>Extension</i> (Kettenverlängerung)
22 Zyklen	95 °C - 30 sec	Denaturierung
	61 °C - 50 sec	<i>Annealing</i>
	72 °C - 40 sec	<i>Extension</i>

3.5.2 HLA-DRB1*15-Primer

Die HLA-DRB1*15-Genotypisierung in der Gruppe der MS-Patienten erfolgte mittels PCR nach einem Protokoll von Bein G et al. (1992). Der Name der *Primer* leitet sich von der Aminosäure und ihrer Position in der DR-β-Kette ab, auf deren Codon im Exon 2 der Primer mit seiner freien 3'-Hydroxygruppe endet. Die verwendeten *Primer* sind wie folgt dargestellt:

Tab. 9: HLA-DRB1*15-*Primer*

HLA-DRB1*15- <i>Primer</i>	Sequenz von 5' - 3'	Produktlänge (bp)
71 A	TCC ACC GCG GCC CGC G	16
13 R	CAC GTT TCC TGT GGC AGC CTA AGA	24

3.6 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Die 2%-igen Agarosegele wurden mittels 100ml Puffer-Agarose-Gemisch (1x TAE-Puffer) und 10 µl Ethidiumbromid auf einem Heiz-Magnetrührer hergestellt. Vor dem Auftragen der PCR-Produkte wurden zu jeweils 10 µl PCR-Produkt 2 µl *loading buffer* gegeben. Der Molekulargewichtsstandard (100 bp DNA *ladder*) wurde 1:10 mit Aqua dest.

verdünnt und 8 µl davon ebenfalls mit 2 µl *loading buffer* versetzt. Die Elektrophorese lief bei 120 V etwa 30 min, bis der blaue Farbstoff des *loading buffers* ungefähr 2/3 des Gels gelaufen war. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und ermöglicht somit ein Sichtbarmachen derselben. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Tisch (322 nm) sichtbar gemacht und mit einer angeschlossenen Fotoeinheit dokumentiert.

3.7 DNA- Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchs von Sanger. Im *Cycle-Sequencing*-Verfahren werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide als Terminatoren eingesetzt. Diese enthalten am 5'-Ende keine OH- Gruppe, so dass beim Einbau in die DNA die Kette an dieser Stelle im nächsten Zyklus nicht mehr verlängert wird. Die zur Analyse notwendigen DNA-Kopien werden durch mehrmaliges Wiederholen des dreiteiligen Zyklus (Denaturierung - *Annealin* - *Extension*) erzeugt. Dazu wurde das ABI *Prism Big Dye Terminator* DNA-Sequenzierungskit nach Herstellerangaben verwendet.

Die Sequenzierungs- *Primer* sind in Tabelle 11 aufgeführt. Ein Reaktionsansatz (20 µl) besteht aus 50 ng genomischer DNA, 1x *Taq buffer*, 0,2 mmol/l dNTPs, 0,5 µmol/l von jedem IL-4R-Sequenzier-*Primer* und 0,5U *AmpliTaQ Gold*. Die $MgCl_2$ -Konzentration betrug 1,5 mmol/l. Das *Thermo-Cycle*-Programm läuft wie oben beschrieben. Der Reaktionsansatz (20 µl) für die 2. PCR umfaßt 4µl *Terminator Ready Reaction Mix*, 1,5 µl des ersten PCR-Produkts und 0,5 µmol/l vom Sequenzier-*Primer*. Folgendes *Thermo-Cycle*-Programm wurde verwendet:

Tab. 10: *Cycle*-Programm zur DNA-Sequenzierung

25 Zyklen	95 °C - 10 sec	Denaturierung
	50 °C - 5 sec	<i>Annealing</i>
	60 °C - 4 sec	Extension (Kettenverlängerung)

Vor der Sequenzierung im Sequenziergerät ABI Prism 310 Genetic Analyzer wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt, wobei sich in einem Ansatz (360 µl) 20 µl vom 2. PCR-Produkt, 10 µl Natrium-Acetat (pH 4,6) und 250 µl 100% Ethanol befinden. Nach Zentrifugation für 20 min bei 13000 x*g wurde das Ethanol abpipettiert und mit 250µl 70% Ethanol für 5 min bei 13000 x*g wieder zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet ca. 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach in 25 µl *Template Suspension Reagent* (TSR) gelöst und in *Genetic Analyzer Sample*-Röhrchen überführt.

Nach Denaturierung bei 90°C für 2 min und Abkühlung der Proben, werden diese in das Sequenziergerät eingesetzt.

Tab. 11: Parameter der IL-4R-Sequenzier-*Primer*

SNP	<i>Primer</i> ^a	Sequenz von 5'-3'	Produktlänge (bp)
I 50 V	50-seq-up	ATG TCC CGG ACA CAG CTG T	277
	50-seq-do	AGG CAG CTG TGG GAA CAC A	
E 375 A C 406 R S 411 L	375-411-seq-up	AGG GAG CTT CTG TGC ATC G	268
	375-411-seq-do	ACT TGG CTC CAG GTG GAG A	
S 478 P	478-seq-up	CTG ACT TGC ACA GAG ACG C	150
	478-seq-do	GGG CAT CTC GGG TTC TAC T	
Q 551 R	551-seq-up	AGC TCT CTG AGC CAA CCA C	252
	551-seq-do	TCT CTG GGG ACA CAG CAC T	
S 761 P	761-seq-up	TGC TGT GGA GAC AGG TCC T	291
	761-seq-do	TGG ATA AGC CCT AGT CCT CA	

^a up = *upstream primer*; do = *downstream primer*

3.8 Allergie-Tests

Die Messung der Gesamt-IgE-Spiegel erfolgte mittels CAP Enzymimmunoassay (FEIA). Spezifische IgE-Antikörper gegen die häufigsten Inhalationsallergene (Lieschgras, Roggen, Birke, Beifuß, Hausstaub, Katzen- und Hundeschuppen und *Cladosporium herbarum*) wurde mit dem Phadiatop SX1-Test bestimmt. Die Patientenseren wurden nach Herstellerangaben in der dermatologischen Universitätsklinik Gießen (Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Schill) untersucht.

3.9 Bestimmung der *myelin-oligodendrocyte-glycoprotein*-Autoantikörper

Die Bestimmung von *myelin-oligodendrocyte-glycoprotein* (MOG)-Autoantikörpern bei 100 MS-Kranken wurde durch Herrn Dr. med. Frank Weber in der neurologischen Universitätsklinik in Göttingen mittels ELISA durchgeführt. Eine Beschichtung der ELISA Platten erfolgte mit 5 µg/ml rekombinanten MOG (Brehm U et al., 1999) in PBS. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Von jeder Patientenserum-Extinktion wurde eine Kontroll-Extinktion subtrahiert. Positive Ergebnisse in Bezug auf den Youden-Index im Vergleich zu 18 gesunden Spendern, indem die maximale Spezifität und Sensitivität im Vergleich mit gesunden kalkuliert wurden (Youden WJ et al. 1950). Zur Kontrolle wurde bei den positiven Vertiefungen das Experiment wiederholt.

3.10 Durchflußzytometrische Analyse der CD23-Expression

3.10.1 Lymphozyten-Gewinnung

Von 15 Probanden wurden 10 ml Lithium-Heparinblut zwischen 8.00 und 10.00 Uhr abgenommen. Je 4 ml Blut wurden über 5 ml Ficoll (1,077 g/ml) geschichtet. Nach Gradientenzentrifugation bei 3000 x*g für 10 min konnten die in der Interphase befindlichen mononukleären Zellen isoliert werden. Nach Abtrennung der Thrombozyten durch Zentrifugation bei 800 x*g für 10 min wurde der Ansatz noch zweimal für 5 min bei 1800 x*g gewaschen. Alle Waschschrte wurden mit RPMI (ohne L-Glutamin) vorgenommen.

3.10.2 Lymphozyten-Kultur

Jeweils 10⁶ Zellen pro ml Kulturmedium wurden in *Mikrowell*-Flachbodenplatten im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre kultiviert. Die eine Hälfte der Zellen wurde mit Interleukin-4 inkubiert, die andere Hälfte nativ belassen. Nach Kulturrende wurde der Kulturansatz mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) für 5 min bei 1800 x*g gewaschen. Die Zellen wurden mit 1%-igem Paraformaldehyd 5 min im Dunklen inkubiert und dann zweimal mit PBS für 5 min bei 1800 x*g gewaschen.

3.10.3 Antikörpermarkierung

Die Antikörpermarkierung erfolgte durch 30 min Inkubation bei RT im Dunkeln mit monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Zur Detektion der B-Lymphozyten wurde ein PE-konjugierter monoklonaler Antikörper (Anti-CD19-PE) gegen das konstitutiv exprimierte Oberflächenprotein CD19 eingesetzt. Ein FITC-markierter monoklonaler Antikörper detektiert CD23. Die Eingrenzung der unspezifischen Färbung erfolgte mittels Isotypenkontrollantikörper (Maus IgG1-FITC). Die Antikörperkonzentrationen richteten sich nach Herstellerangaben. Überschüssige Antikörper wurden nach Inkubation durch einmaliges Waschen mit PBS für 5 min bei 1800 x*g entfernt.

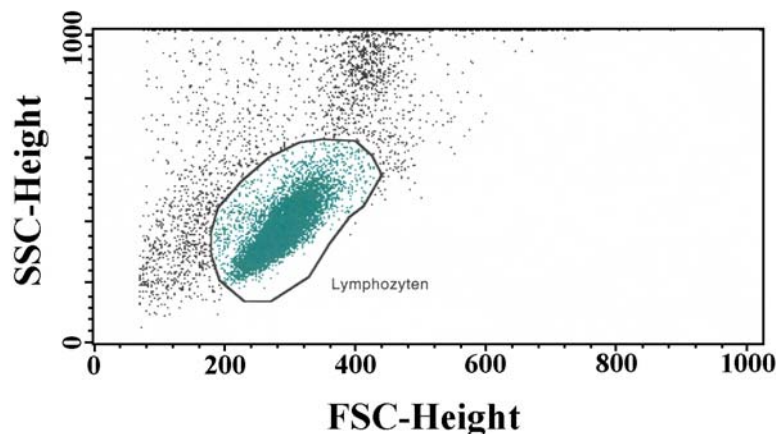
3.10.4 Durchflußzytometrie

Probenanalyse und Auswertung erfolgten am FACS Calibur-Durchflußzytometer der Fa. Becton Dickinson mit dem Programm Cell Quest. Mit der Durchflußzytometrie werden Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension nach Antikörpermarkierung gegen spezifische Oberflächenmarker (*Cluster of Differentiation*, CD) gemessen. Die Zellsuspension wird über eine feine Kapillare in den Messbereich geleitet. Ein Mantelstrom aus isotoner Pufferlösung erzeugt mit dem Probenstrom eine laminare Strömung, so dass die Zellen perlenkettenartig aneinandergereiht dem Analysenpunkt zugeführt werden (hydrodynamische Fokussierung). Dort trifft monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm auf die Einzelzelle. Der größte Anteil des Lichtes wird vorwärts gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (*foreward scatter*= FSC) nach Ausblendung des ungebrochenen Zentralstrahles ein Maß für die Größe der Zelle darstellt. Ein weiterer Teil des Lichtes wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut (Seitwärtsstreulicht= SSL; *side scatter*= SSC) bezeichnet. Das Maß der Seitwärtsstreuung ist von der Granularität der Zelle abhängig. Die Fluoreszenzfarbstoffe der Antikörper gefärbten Zellen werden durch das Laserlicht zur Fluoreszenz angeregt. Das Fluoreszenzspektrum von FITC weist ein Maximum bei 515 nm (gelb-grün), das von PE ein Maximum bei 580 nm (rot-orange) auf. Damit sind die Gipfel der Emissionsmaxima deutlich voneinander zu unterscheiden.

3.10.5 Darstellung der Messergebnisse

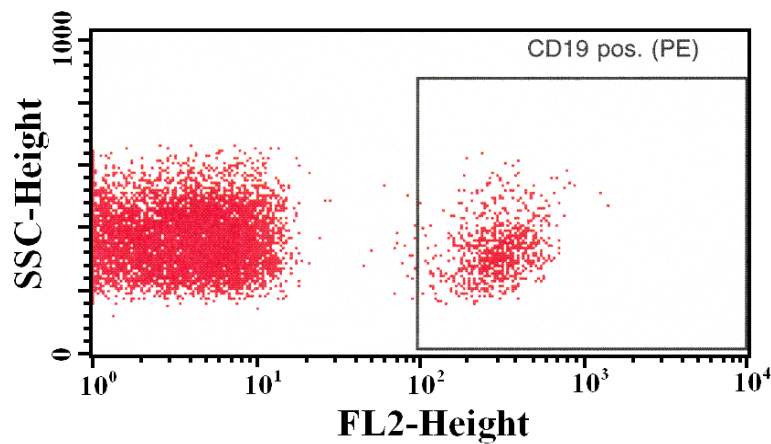
Als Basis für die Auswertung der erhaltenen Daten dient die zweidimensionale Auftragung von Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht. Der Schnittpunkt der zwei Messparameter wird im Punkthistogramm (*Dot blot*) graphisch als ein Punkt dargestellt, wobei jeder Punkt für eine bestimmte Zelle mit ihren Merkmalen steht. Dadurch wird eine Diskriminierung von Debris und verschiedenen Zellpopulationen aufgrund Größe und Oberflächenbeschaffenheit derselben erreicht. Nur ein Teil der Messereignisse wird zur Auswertung herangezogen. Im FSC/SSC-Diagramm können die Zellpopulationen mittels eines Auswertungsfensters hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften gesondert betrachtet werden (*Gating*). Bei unseren Untersuchungen wird ein Fenster um die Lymphozytenpopulation gelegt (Abb. 4).

Abb. 4: FSC/SSC-Diagramm mit Fenster um die Lymphozytenpopulation
(Originalregistrierung)



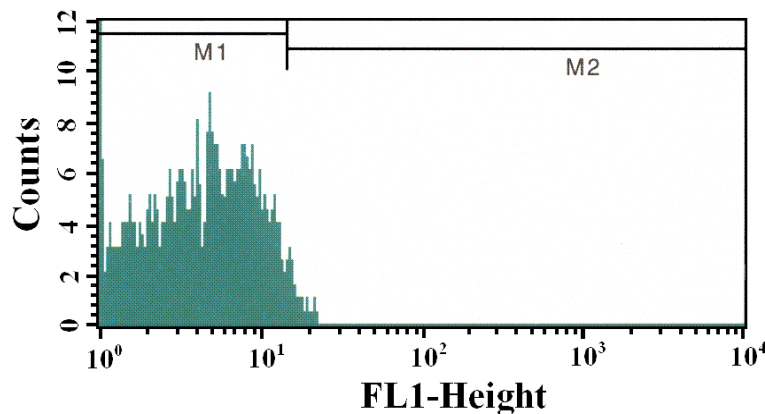
Nach Eingrenzen der Lymphozytenpopulation wird in einem weiteren Diagramm SSC gegen FL2 (PE-Fluoreszenz) aufgetragen, in dem die CD19-positiven Lymphozyten (entsprechen den B-Lymphozyten) von den restlichen Lymphozyten abgetrennt werden können (Abb. 5).

Abb. 5: Abgrenzung der CD19-positiven Lymphozyten im SSC/FL2-Diagramm
(Originalregistrierung)



Zur Analyse der Fluoreszenzintensitätsverteilung von Anti-CD23-Antikörpern auf CD19-positiven Zellen findet eine eindimensionale Auftragung im Histogramm statt. Die Ordinate zeigt die Häufigkeit der Zellen, die Abszisse die Fluoreszenzintensität. Niedrige Fluoreszenzintensitäten erscheinen dabei am linken Rand der Darstellung (niedrige FL1), höhere Fluoreszenzintensitäten weiter rechts am Rand. Vorher erfolgt die Abgrenzung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz der CD19-positiven Lymphozyten durch eine mit Isotypkontrollantikörpern gefärbte Negativkontrolle. Dieser Bereich wird definitionsgemäß auf 98% der B-Lymphozytenpopulation festgesetzt und durch ein Auswertefenster (M1) von den interessierenden restlichen 2% der Zellen (M2) abgegrenzt (Abb. 6).

Abb. 6: Negativkontrolle mit unspezifischer Hintergrundfluoreszenz im M1-Fenster
(Originalregistrierung)



3.11 Statistische Auswertung

3.11.1 Genetische Assoziation

Die Daten der Assoziationsanalysen wurden mittels Chi-Quadrat-Test, Fisher's exact-Test und Mann-Whitney-U-Test analysiert. Statistische Berechnungen erfolgten mittels der SPSS^R Software Vers. 10.0 und der GraphPad PRISM[™] 2c Software. Wenn im Text nicht anders angegeben, wurden die p-Werte mittels Chi-Quadrat-Test kalkuliert. Alle Tests wurden zweiseitig mit einem Konfidenzintervall (CI) von 95% durchgeführt. Signifikante p-Werte wurden nach Bonferroni korrigiert (Signifikanzlevel dividiert durch die Zahl der statistischen Untersuchungen). Zur Sicherung der Zufallsauswahl der Blutspender und der MS-Patienten wurde das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht untersucht (Guo SW, Thompson EA 1992). Kopplungsungleichgewichte zwischen den IL4R-SNPs wurden mittels *likelihood-ratio*-Test berechnet (Slatkin M, Excoffier L, 1996). Zur Berechnung der *maximum-likelihood*-Haplotypenfrequenzen wurde ein *Expectation-maximization*-Algorithmus herangezogen (Dempster A et al., 1977. Excoffier L, Slatkin M, 1995). Für die Berechnungen der Haplotypenfrequenzen, Kopplungsungleichgewichte und Hardy-Weinberg-Gleichgewichte wurde das Arlequin Software Paket genutzt (Schneider S et al., 1997).

3.11.2 CD23-Expression auf B-Lymphozyten

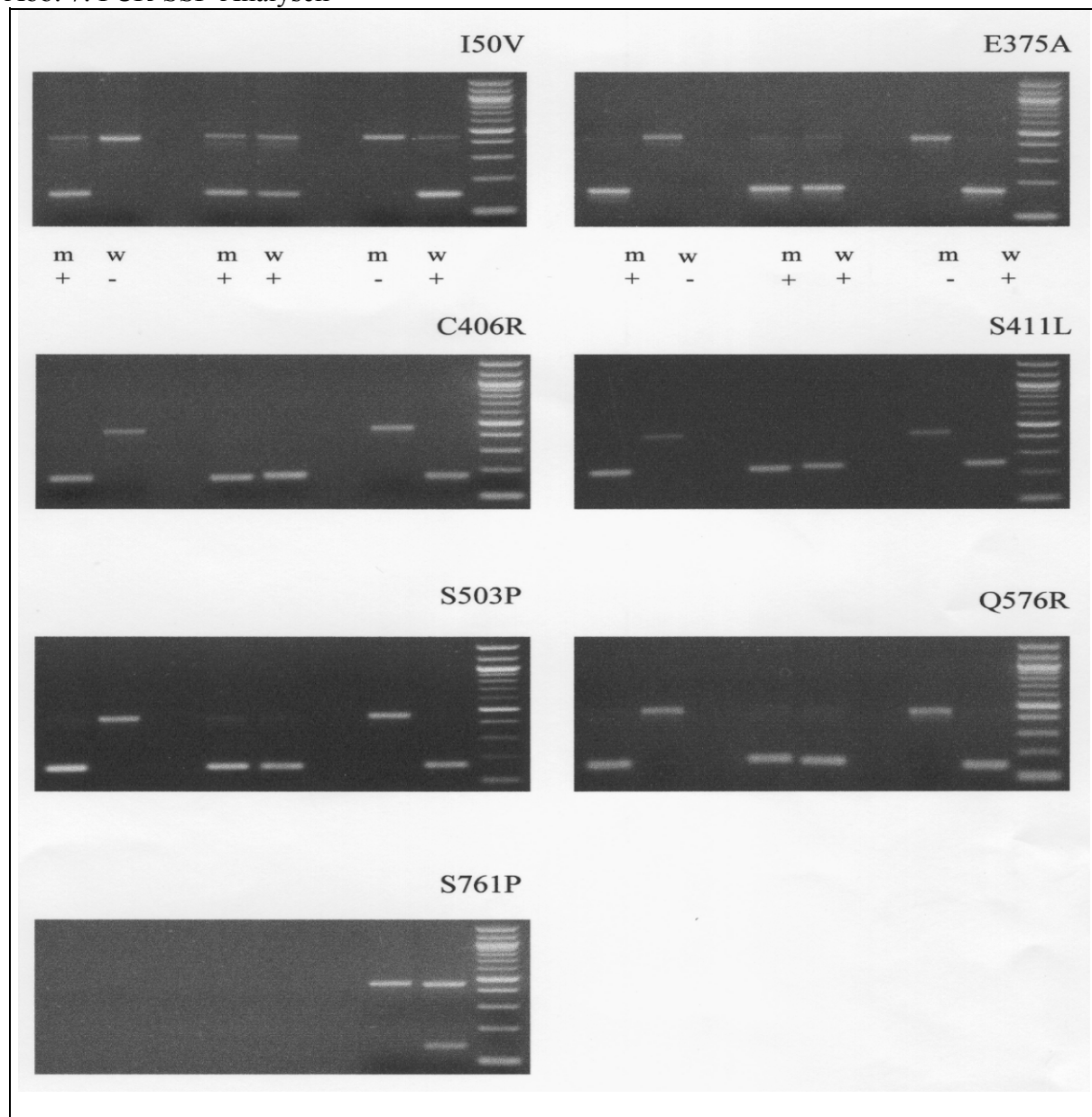
Die statistische Auswertung der durchflußzytometrischen Messungen mit der Software Cell Quest (Fa. Becton Dickinson) basiert auf der Auswertung der Histogramm- und Zweiparameter-Darstellungen. Gezeigt werden können mehrere Parameter, wie die Anzahl der Ereignisse, die relativen Prozentanteile, der Mittelwert, der Median und der Modus der Signalintensität. Bei jeder Probe wurde die Signalintensität von 10.000 Zellen gemessen und hinsichtlich des Medians (MFI = Median der Fluoreszenzintensität) ausgewertet. Statistische Berechnungen erfolgten mittels der SPSS^R Software Vers. 10.0. Für Vergleiche zwischen den Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

4. ERGEBNISSE

4.1 PCR-SSP-Genotypisierung

Die Genotypisierung der insgesamt sieben IL4R-SNPs mittels SSP-PCR ergaben für jedes Allel ein DNA-Fragment bestimmter Länge. In der Abbildung 7 sind exemplarisch PCR-SSP-Analysen dargestellt.

Abb. 7: PCR-SSP-Analysen



Neben einer 100 bp DNA-Leiter (rechts im Gel) befinden sich in der unteren Reihe die Fragmente der verschiedenen Allele, wenn das Zielallel in heterozygoter oder homozygoter Form vorlag. Mit „m,“ bezeichnete Banden zeigen die Produkte der PCR für das mutierte Allel, mit „w,“ bezeichnete Banden die für das Wildtypallel. Zeigte sich keine allelspezifische IL4R-Bande, so musste das Fragment (ca. 440 bp) der internen Kontrolle nachweisbar sein (obere Reihe). Dafür dienten die *Primer* für das C-reaktive Protein (CRP).

4.1.1 Validierung der PCR-SSP-Ergebnisse

Validiert wurden die PCR-Ergebnisse durch direkte Sequenzierung von 20 Probanden mit unterschiedlichem Genotyp. Die Sequenzierungen stimmten zu 100% mit den PCR-SSP-Analysen überein. Zum Nachweis der Reliabilität wurden bei jedem PCR-Experiment, außer für die Variante S761P, positive und negative Kontrollen eines Probanden mitgeführt, die durch DNA-Sequenzierung getestet waren. Da für den Polymorphismus S761P keine Kontroll-DNA zur Verfügung stand, wurden die PCR-Ergebnisse durch DNA-Sequenzierung aller 158 Probanden validiert.

4.2 Allelfrequenzen der IL4R-SNPs

Die PCR-SSP-Genotypisierung der 158 Probanden ergab die in Tabelle 12 dargestellten Allelfrequenzen aller IL4R-SNPs.

Tab.12: Allelfrequenzen der IL4R-SNPs

Allel	Frequenz (%)	Allel	Frequenz (%)	Allel	Frequenz (%)	Allel	Frequenz (%)
I50	56,01	V50	43,99	S478	84,49	P478	15,51
E375	89,24	A375	10,67	Q551	82,90	R551	17,10
C406	89,24	R406	10,67	S761	100,00	P761	0,00
S411	97,47	L411	2,53				

Die Rate der homozygoten und heterozygoten Kombinationen war, außer bei der Variante S761P, im Einklang mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, so dass eine homogene Population bestätigt werden konnte. Bei dem Polymorphismus S761P waren alle Probanden homozygot für das Wildtypallel. Somit wurde die S761P-Variante nicht in die weiteren statistischen Analysen miteinbezogen.

4.3 IL4R-Haplotypstruktur

Die Berechnung von Kopplungsungleichgewichten zwischen den untersuchten IL4R-SNPs erbrachte wesentliche Unterschiede (Tab.13).

Tab.13: Kopplungsungleichgewichte zwischen den IL4R-SNPs

SNP	I50V	E375A	C406R	S411L	S478P	Q551R
I50V	*	n.s.	n.s.	<0,01	0,01	n.s.
E375A	n.s.	*	<0,01	n.s.	<0,01	<0,01
C406R	n.s.	<0,01	*	n.s.	<0,01	<0,01
S411L	<0,01	n.s.	n.s.	*	<0,01	<0,01
S478P	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	*	<0,01
Q551R	n.s.	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	*

n.s. = nicht signifikant

Auf der Basis eines *Expectation-Maximization*-Algorithmus wurden putative IL4R-Haplotypen berechnet. Insgesamt ließen sich 11 putative IL4R-Haplotypen identifizieren (Tab.14), wobei allein vier Haplotypen eine kumulativen Häufigkeit von >90% ergaben.

Tab.14: Kalkulierte IL4R-Haplotypen

Haplotypen	kalkulierte Häufigkeiten (%)	St. Ab.	IL4R- Polymorphismen						
			I50V	E375A	C406R	S411L	S478P	Q551R	S761P
IL4R*01	49,663	0,02561	1	1	1	1	1	1	1
IL4R*02	32,602	0,02793	2	1	1	1	1	1	1
IL4R*03	6,441	0,02097	2	2	2	1	2	2	1
IL4R*04	3,994	0,01470	1	2	2	1	2	2	1
IL4R*05	2,228	0,00716	1	1	1	1	1	2	1
IL4R*06	2,185	0,00977	2	1	1	2	2	2	1
IL4R*07	1,480	0,00643	2	1	1	1	2	2	1
IL4R*08	0,414	0,00362	1	1	1	1	2	2	1
IL4R*09	0,346	0,00444	1	1	1	2	2	2	1
IL4R*10	0,325	0,00301	2	2	2	1	2	1	1
IL4R*11	0,322	0,00310	2	1	1	1	2	1	1

1 = wildtyp Allel, 2 = mutiertes Allel , St.Ab. = Standardabweichung

4.4 Genetische Assoziation mit Atopie-Phänotypen

4.4.1 Assoziation der biochemischen Atopiemarker mit der Atopieanamnese

Das Vorkommen der biochemischen Atopiemarker der Probanden wurde verglichen mit der Atopieanamnese und der Atopieanamnese in der Familie (Tab.15). Dabei ergab sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven Atopieanamnese und erhöhtem Gesamt-IgE-Spiegel sowie positivem SX1-Test ($p < 0,001$). Ähnlich groß war der Zusammenhang zwischen einer positiven Familienanamnese und einem positivem SX1-Test ($p = 0,004$).

Tab. 15: Assoziation der biochemischen Atopiemarker mit der Atopieanamnese

Merkmale	Gesamt (n=158)	Atopieanamnese		p-Werte	Atopie in Familie ^a		p-Werte
		Ja (n=43)	Nein (n=115)		Ja (n=54)	Nein (n=89)	
% mit erhöhtem IgE (>100 kU/l)	27,2	48,8	19,1	$<0,001^b$	37	22,5	$0,06^b$
Serum-IgE (kU/l)	48,1	90,3	38	$0,001^c$	66,1	39,2	$0,13^c$
geom. Mittel + 2 SD	(56)	(98,3)	(45,3)		(75,6)	(46,1)	
% mit positivem SX1-Test	38,6	79,1	23,5	$<0,001^b$	51,9	28,1	$0,004^b$
% mit Atopie (erhöhtes IgE/ Pos. SX1-Test)	43	83,7	27,8	$<0,001^b$	57,4	32,6	$0,004^b$

^a 15 Probanden wußten nicht, ob Ihre Verwandten Atopiker sind

^b Chi-Quadrat Analyse, zweiseitig

^c Mann-Whitney-U-Test

4.4.2 Assoziation der IL4R-SNPs mit Atopiemarkern

Zwischen den IL4R SNPs und den dichotomen Parametern „spezifische Sensibilisierung“, „Atopie“, „klinische Atopieanamnese“ und „Familienanamnese“ zeigte sich mittels der Chi-Quadrat-Analyse keine Assoziation.

Dagegen zeigte sich zwischen den mutierten IL4R-SNPs und niedrigeren IgE-Werten eine Assoziation. Signifikant war diese Assoziation allerdings nur in der Gruppe der Nicht-Atopiker (Tab.16). Dabei stellen die Atopiker die kleinere Gruppe dar ($n = 68$) und zeigen eine größere Varianz der IgE-Spiegel (Varianz der logarithmierten Gesamt-IgE-Werte bei

Atopikern 0,27, bei Nicht-Atopikern 0,13). Die mutierten Varianten A375, R406 und P478 waren bei den Nicht-Atopikern signifikant mit niedrigeren Gesamt-IgE-Werten assoziiert.

Tab.16: Assoziation der IL4R-SNPs mit Gesamt-IgE-Werten

Varianten	Geometrisches Mittel IgE + 2 St.Ab. ^a (kU/l)					
	Gesamt (n=158)		p-Wert ^b	Nicht-Atopiker (n=90)		p-Wert ^b
	wild	mutiert		wild	mutiert	
I50V	55.2 (62)	45.3 (53.6)	n.s.	24.2 (28.6)	20.7 (25.4)	n.s.
E375A	51.2 (59)	37.5 (45.7)	n.s.	23.9 (28.4)	14 (18.6)	0.017
C406R	50.5 (58.2)	39.6 (48.5)	n.s.	23.9 (28.4)	14 (18.6)	0.017
S411L	49.3 (57.1)	28.4 (37.5)	n.s.	21.8 (26.4)	18.4 (24.3)	n.s.
S478P	51.8 (59.5)	40.2 (48.5)	n.s.	24.6 (29)	15.6 (20.5)	0.033
Q551R	50.9 (58.9)	42.3 (50.1)	n.s.	23.2 (27.6)	18.4 (23.6)	n.s.

^a Oberes Limit des 95% Konfidenzintervalls

n.s. = nicht signifikant (Signifikanzlevel 0,05)

^b Mann-Whitney-U-Test

St.Ab. = Standardabweichung

4.5 Genetische Assoziation mit Multipler Sklerose

4.5.1 IL4R-Varianten bei MS-Patienten und Kontrollpersonen

Von den 341 MS-Patienten wurden die ersten 100 Patienten für die IL4R-SNPs I50V, E375A, C406R, S411L, S478P und Q551R genotypisiert und die Allelfrequenzen mit der Kontrollgruppe verglichen. Dabei zeigte sich bei den Varianten R551 (p=0,025) und, in geringerem Ausmaß, bei L411 eine Überrepräsentation im Vergleich zu gesunden Probanden (n=305). Die weitere Analyse aller 341 MS-Patienten hinsichtlich dieser beiden SNPs konnte diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Tab.17). Die Beachtung des Geschlechterverhältnisses beim Vergleich der MS-Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte keine Unterschiede in den Ergebnissen.

Tab. 17: Genotypfrequenzen der IL4R-SNPs bei MS-Patienten und Kontrollpersonen

IL4R-SNPs		MSPatienten			Kontrollen			p-Wert ^a
Position	Genotyp ^b	%	(n)	Patienten -anzahl	%	(n)	Patienten -anzahl	
I50V	ww	29,00	(29)	100	31,68	(96)	303	n.s.
	wm	52,00	(52)		46,20	(140)		
	mm	19,00	(19)		22,11	(67)		
E375A	ww	77,00	(77)	100	80,00	(128)	160	n.s.
	wm	23,00	(23)		18,75	(30)		
	mm	0	(0)		1,25	(2)		
C406R	ww	77,00	(77)	100	80,00	(128)	160	n.s.
	wm	23,00	(23)		18,75	(30)		
	mm	0	(0)		1,25	(2)		
S411L	ww	92,37	(315)	341	94,00	(282)	300	n.s.
	wm	7,04	(24)		5,66	(17)		
	mm	0,59	(2)		0,33	(1)		
S478P	ww	62,00	(62)	100	69,51	(212)	305	n.s.
	wm	35,00	(35)		28,85	(88)		
	mm	3,00	(3)		1,64	(5)		
Q551R	ww	62,75	(214)	341	65,25	(199)	305	n.s.
	wm	32,26	(110)		31,80	(97)		
	mm	4,99	(17)		2,95	(9)		

Chi-Quadrat-Test, zweiseitig ^a n.s. = nicht signifikant

^b ww = homozygot wild, wm = heterozygot, mm = homozygot mutiert

4.5.2 Assoziation der IL4R-SNPs mit *myelin-oligodendrocyte-glycoprotein*-Autoantikörpern

Die Messung von *myelin-oligodendrocyte-glycoprotein* (MOG)-Autoantikörpern bei 100 untersuchten MS-Patienten erbrachte bei zwölf Patienten einen positiven Nachweis. Die Frequenz dieser MOG-Antikörper bei Patienten mit den mutierten IL4R-SNPs V50, A375, R406 und P478 unterschied sich nicht von der Frequenz bei Patienten mit Wildtyp. Dagegen

zeigten sich bei Patienten mit den IL4R-Varianten L411 (MOG-Antikörper Prävalenz von 33% bzw. von 9%, $p=0,037$) und R551 (MOG-Antikörper Prävalenz von 21% bzw. von 5%, $p=0,028$, Fisher's exact-Test, zweiseitig) MOG-Antikörper häufiger als bei MS-Patienten ohne diese Mutationen. Nach Bonferoni-Korrektur waren diese Unterschiede nicht signifikant.

Andere Parameter wie Erkrankungsdauer, Krankheitsverlauf oder Therapie zeigten keinen signifikanten Zusammenhang mit der MOG-Antikörperproduktion.

4.5.3 Assoziation zwischen L411 bzw. R551 und den MS-Hauptformen

Durch Stratifizierung der 341 MS-Patienten in die drei klinischen Hauptformen zeigte sich ein Überwiegen der R551-Variante bei PPMS-Patienten im Vergleich zu RR/SPMS-Patienten. Patienten mit PPMS zeigten ebenfalls eine Häufung der R551-Variante im Vergleich zu 305 Kontrollpersonen. Nach Bonferroni-Korrektur bleiben nur die Genotypenunterschiede zwischen PPMS-Patienten und Kontrollpersonen signifikant ($p=0,018$). Die seltene L411-Variante, die sich in einem signifikanten Kopplungsungleichgewicht mit der R551-Variante befindet, zeigt eine schwache Assoziation zu PPMS (Allelfrequenz 9,4%) im Vergleich zu RR/SPMS (Allelfrequenz 3,3%, $p=0,012$ Fisher's exact test, zweiseitig) und zur Kontrolle (Allelfrequenz 3,2%, $p=0,009$ Fisher's exact-Test, zweiseitig). Nach Bonferoni-Korrektur waren diese Unterschiede nicht signifikant ($p=0,2$ bzw. $p=0,16$). Es zeigte sich kein Zusammenhang der Mutationen mit dem Krankheitsbeginn oder der Progressionsrate. Die Tabelle 18 zeigt die Genotyp- und Allelfrequenzen der S411L und Q551R Varianten bei MS-Patienten bezogen auf den klinischen Verlauf und im Vergleich zu den Kontrollpersonen.

Tab.18: Genotyp- und Allelfrequenzen der IL4R-Varianten S411L und Q551R bei MS-Patienten bezüglich des klinischen Verlaufs und im Vergleich mit der Kontrollgruppe

IL4RA-SNPs ^a		RR/SPMS ^b		PPMS ^b		Kontrolle		p-Werte (nach Bonferoni- Korrektur)		
		(n=284)		(n=48)		(n=300-305)				
		%	(n)	%	(n)	%	(n)	RR/SPMS vs. PPMS	RR/SPMS vs. Kontrolle	PPMS vs. Kontrolle
S411L ^c	ww	93,3	(265)	85,4	(41)	94	(282)	n.s.	n.s.	n.s.
	wm	6,7	(19)	10,4	(5)	5,7	(17)			
	mm	0	(0)	4,2	(2)	0,3	(1)			
S411L	Allel	96,7		90,6		96,8		0,012 (0,2)	n.s.	0,009 (0,16)
L411	Allel	3,3		9,4		3,2				
Q551R	ww	63,7	(181)	54,2	(26)	65,2	(199)	0,005 (0,09)	n.s.	0,001 (0,018)
	wm	32,7	(93)	31,3	(15)	31,8	(97)			
	mm	3,5	(10)	14,6	(7)	3	(9)			
Q551	Allel	19,9		30,2		18,9		0,023 (0,4)	n.s.	0,01 (0,18)
R551	Allel	80,1		69,8		81,1				

^a ww=homozygot wild, wm=heterozygot, mm=homozygot mutiert

^b Neun der 341 MS-Patienten konnten den Gruppen RRMS/ SPMS und PPMS nicht zugeordnet werden

^c Aufgrund der geringen Fallzahlen wurden die Daten heterozygot und homozygot mutierter Probanden addiert
n.s. = nicht signifikant

4.5.4 Stratifizierung in HLA-DRB1*15 -positive und -negative MS-Patienten

Die Häufigkeit der HLA-DRB1*15-positiven MS-Patienten beträgt 56,9% (194/341 Patienten). Eine Stratifizierung in HLA-DRB1*15-positive und -negative Patienten (Tabelle 19) zeigt, dass die Prävalenz der IL4RA-Allele L411 und R551 statistisch unabhängig von der Präsenz des HLA-DRB1*15-Allels ist (Chi-Quadrat-Test, zweiseitig). Die Verteilung der HLA-DRB1*15-Allele in den Hauptgruppen der MS war ebenfalls ähnlich (Chi-Quadrat-Test, zweiseitig). Des weiteren zeigte sich keine Assoziation der HLA-DRB1*15-Allele mit der MOG-Autoantikörperproduktion, dem Alter beim Krankheitsbeginns sowie der Progressionsrate.

Tab.19: Verteilung der IL4R-Varianten L411 und R551 bei HLA-DRB1*15 -positiven und -negativen MS-Patienten und Prävalenz von HLA-DRB1*15 bezüglich des klinischen Verlaufs^a

IL4R Variante	Genotyp ^b	HLA-DRB1*15 positiv (n=194)		HLA-DRB1*15 negativ (n=147)	
		%	(n)	%	(n)
S411L	ww	90,7	(176)	94,4	(139)
	wm	8,2	(16)	5,6	(8)
	mm	1	(2)	0	(0)
Q551R	ww	64,9	(126)	59,9	(88)
	wm	29,4	(57)	36	(53)
	mm	5,7	(11)	4,1	(6)
Klinischer Verlauf der MS		HLA-DRB1*15 positiv		HLA-DRB1*15 negativ	
RR/SPMS (n=284)		57,4	(163)	42,6	(121)
PPMS (n=48)		52,1	(25)	47,9	(23)

^a Unterschiede der S411L und Q551R IL4R Genotypen zwischen HLA-DRB1*15 positiven und negativen MS-Patienten waren statistisch nicht signifikant. PPMS und RR/SPMS Patienten unterschieden sich nicht signifikant in Bezug auf die HLA-DRB1*15 Prävalenz.

^b ww=homozygot wild, wm=heterozygot, mm=homozygot mutiert

4.6 CD23-Expression auf B-Lymphozyten nach IL-4 Stimulation

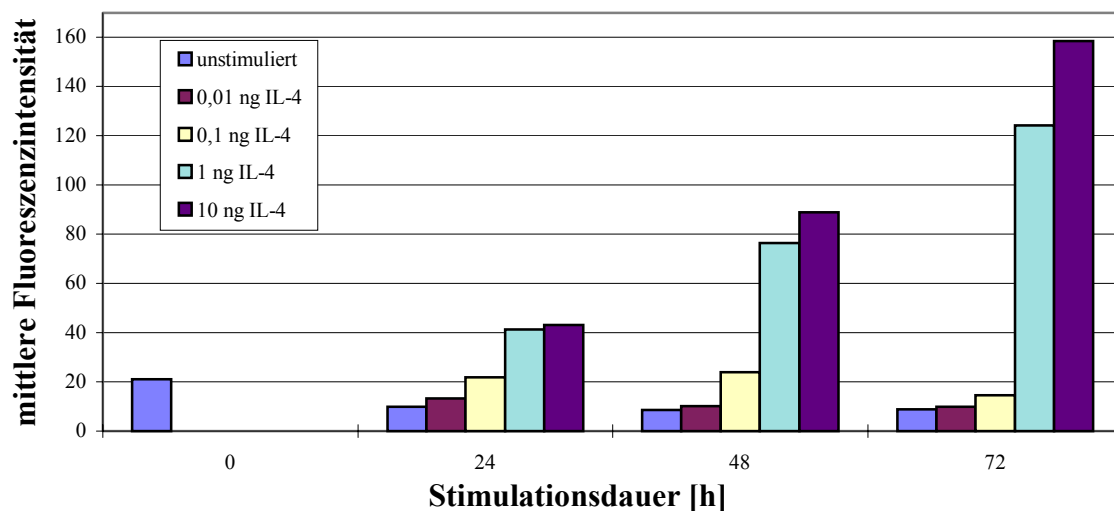
Zur Untersuchung des Einflusses der IL4R-SNPs auf die Funktion des Rezeptorkomplexes wurde die CD23-Expression auf B-Lymphozyten mit und ohne IL-4-Stimulation nach 48 Stunden Kultur durchflußzytometrisch ermittelt. Die B-Lymphozyten wurden mit monoklonalen, PE-markierten Antikörpern gegen CD19 detektiert.

4.6.1 Vorversuche

Zur Entwicklung eines optimalen Inkubationsprotokolls wurden B-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-4 unterschiedlich lange inkubiert. Dazu wurden B-Lymphozyten von drei genotypgleichen Probanden verwendet (Q551R, S478P, S411L: homozygot wild, I50V: heterozygot). Die IL-4-Konzentration und Kulturdauer sollte über den beobachteten Zeitraum eine konstante Zunahme der CD23-Fluoreszenzintensität im mittleren Bereich zeigen, um sowohl stärkere als auch schwächere CD23-Expressionen differenzieren

zu können. Die Fluoreszenzintensität wurde dabei im mittleren Fluoreszenzkanal gemessen. Die Kultur der Zellen wurde mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen an rekombinantem, humanen IL-4 durchgeführt (0 ng, 0,01 ng, 0,1 ng, 1,0 ng und 10,0 ng pro ml Medium). Die Analyse der CD23-Expression erfolgte jeweils zum Zeitpunkt 0 sowie nach 24, 48 und 72 Stunden in Kultur. Zellen ohne IL-4-Stimulation zeigten während der gesamten Kulturdauer eine Abnahme der CD23-Expression. In geringerem Ausmaß war das auch für Zellen mit IL-4-Konzentrationen von 0,01 und 0,1 ng/ml der Fall (Tab. 20). Die optimale IL-4-Konzentration und Inkubationszeit zeigte sich bei einer halbmaximalen CD23-Expressionszunahme unter 1 ng IL-4 pro ml Medium und 48 Stunden.

Tab. 20: Vorversuche zur Ermittlung der optimalen IL-4-Konzentration und Stimulationsdauer



4.6.2 IL-4 induzierte CD23-Expression

Zur Untersuchung des Einflusses der IL4R-Varianten Q551R, S478P, S411L, I50V auf die Rezeptorfunktion wurden Probanden mit spezifischem IL4R-Genotyp ausgewählt (Tab. 21). Für die Messung der IL-4-induzierten CD23-Expression auf den B-Lymphozyten dieser Probanden erfolgte eine Stimulation der Zellen mit 1 ng IL-4/ml Medium für 48 Stunden. Als Kontrolle dienten unstimulierte B-Zellen dieser Probanden. Danach erfolgte die Messung der CD23-Expression auf den Lymphozyten.

Tab. 21: IL4R-Genotypen der Probanden für die FACS-Analyse

Probanden	Q551R	S478P	S411L	I50V	Probanden	Q551R	S478P	S411L	I50V
1	ww	ww	ww	wm	9	wm	wm	ww	mm
2	ww	ww	ww	wm	10	wm	wm	wm	mm
3	ww	ww	ww	ww	11	mm	mm	ww	wm
4	ww	ww	ww	ww	12	mm	wm	wm	ww
5	ww	ww	ww	wm	13	mm	wm	wm	wm
6	wm	wm	ww	ww	14	mm	mm	wm	wm
7	wm	wm	ww	wm	15	mm	mm	ww	wm
8	wm	wm	ww	ww					

ww= homozygot wild, wm= heterozygot, mm= homozygot mutiert

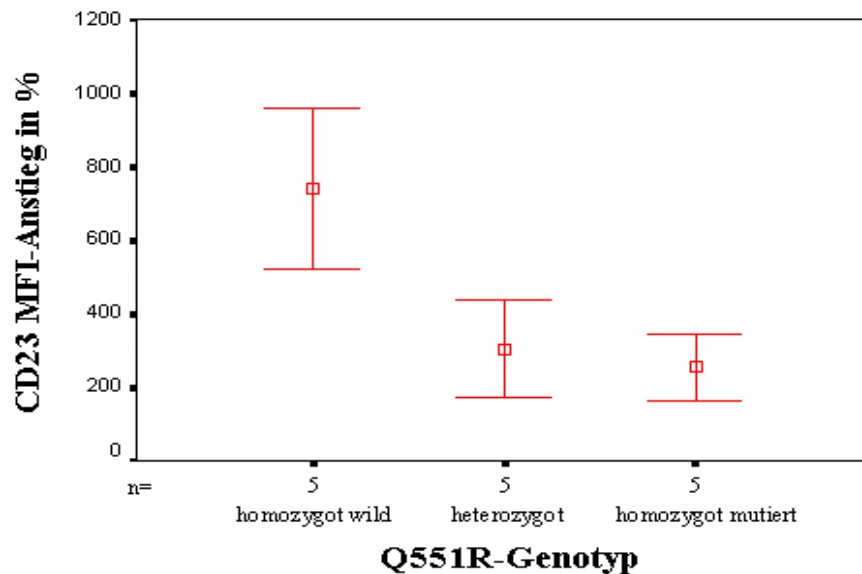
Der Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) nach IL-4-Stimulation wurde auf den Basiswert der CD23-Fluoreszenzintensität unstimulierter B-Lymphozyten zum Zeitpunkt t_0 der Untersuchung bezogen.

Der Basalwert zeigte bei allen Probanden keinen Unterschied in der CD23-Expression. Insgesamt konnte bei Zellen ohne IL-4-Stimulation ein Abfallen der CD23-Expression während der gesamten Kulturdauer von 48 Stunden beobachtet werden. Die Stimulation der Zellen mit 1 ng IL4/ml brachte eine Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität. Die relative Zunahme bezogen auf t_0 war bei den Zellen mit homozygotem Wildtyp der Variante Q551R am größten (MFI- Anstieg um 301,38 % bzw. Stimulationsindex von 3). Die Zellen heterozygoter und homozygot mutierter Probanden waren hingegen deutlich weniger stimulierbar (MFI- Anstieg um 197,92 % bzw. 139,64 %, Stimulationsindex von 1,98 bzw. 1,4).

Nach 48 Stunden Kultur wurde der relative Anstieg der MFI bei stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen für alle untersuchten IL4R-Genotypen berechnet.

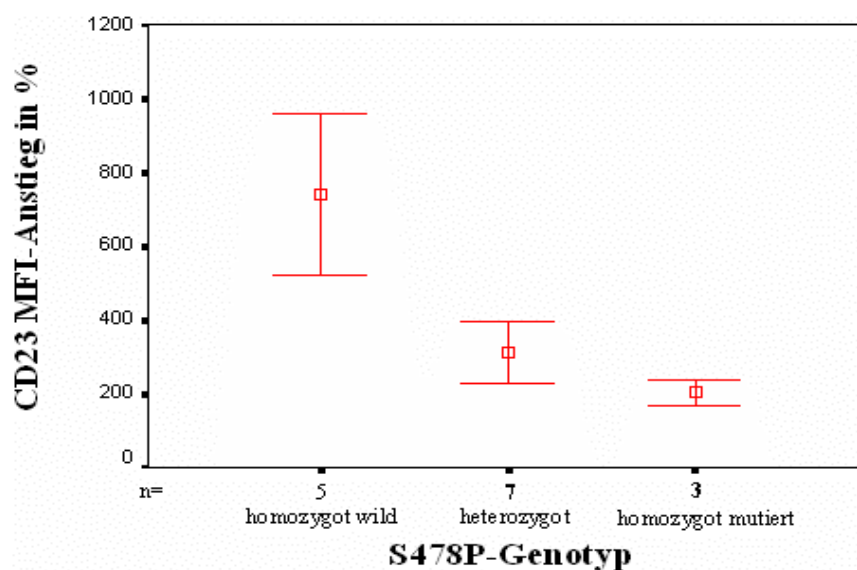
Die Q551R-Variante zeigte bei Vorliegen des homozygoten Wildtyps einen signifikanten Anstieg der relativen MFI im Vergleich zum heterozygoten und homozygot mutierten Genotyp ($p=0,008$ homozygot wild vs. heterozygot, $p=0,008$ homozygot wild vs. homozygot mutiert; Mann-Whitney-U-Test). Die Verteilung der Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Gruppen (je $n=5$) wird in Tabelle 22 deutlich.

Tab. 22: Mittelwert und Standardabweichung des relativen CD23-MFI-Anstiegs nach IL-4-Stimulation stratifiziert für die Q551R-Genotypen



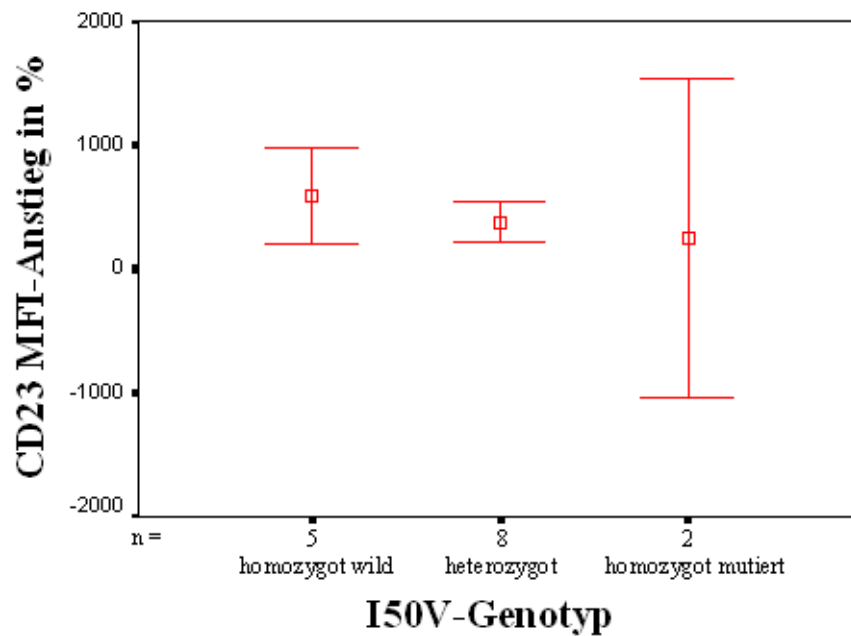
S478P zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der relativen MFI bei Vorliegen des homozygoten Wildtyps im Vergleich zum heterozygoten und homozygot mutierten Genotyp deutlich ($p=0,003$ homozygot wild vs. heterozygot, $p = 0,036$ homozygot wild vs. homozygot mutiert; Mann-Whitney-U-Test). Die Verteilung der Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Genotypgruppen wird in Tabelle 23 deutlich.

Tab. 23: Mittelwert und Standardabweichung des relativen CD23-MFI-Anstiegs nach IL-4-Stimulation stratifiziert für die S478P-Genotypen



Die Untersuchung der IL4R-SNPs S411L und I50V (Tab. 24) erbrachte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem relativen CD23-MFI-Anstieg.

Tab. 24: Mittelwert und Standardabweichung des relativen CD23-MFI-Anstiegs nach IL-4-Stimulation stratifiziert für die I50V-Genotypen



5. DISKUSSION

5.1 Kopplung zwischen genetischen Varianten in der chromosomalen Region 16p12 und Atopie

Mehrere Studien konnten eine Kopplung zwischen Atopie bzw. allergischem Asthma und genetischen Markern in der chromosomalen Region 16p12 nachweisen (Tab. 2). Eine kürzlich durchgeführte Kandidaten-Gen-Studie mit Mikrosatellitenmarkern (He B et al., 1998) ergab ebenfalls eine Kopplung von Markern in der IL4R-Genregion zur Multiplen Sklerose. Aufgrund der Schlüsselrolle von Interleukin-4 und der Tatsache, dass das Gen der Interleukin-4-Rezeptor alpha-Kette (IL4R) im Vergleich zu anderen kodierenden Regionen bekannter Gene hoch polymorph ist (Wu X et al., 2001), gilt IL4R als wichtiges Kandidaten-Gen für atopische Erkrankungen.

Insgesamt sind die Ergebnisse der Kopplungsanalysen jedoch uneinheitlich (Tab. 3). Die Gründe dafür sind vielfältig. Neben dem Kandidaten-Gen IL4R enthält die chromosomale Region 16p12 noch andere, möglicherweise am allergischen Entzündungsgeschehen beteiligte Gene wie z.B. für die Phospholipase A2, den MHC-Klasse II-Transaktivator, CD19, CD43 und CD11a (Wjst M et al., 2002). Wesentliche Unterschiede im Design der durchgeführten Kopplungsanalysen führen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Zu betonen sind hierbei zum einen die Definition des atopischen Phänotyps als Grundlage jeder Kopplungsanalyse und zum anderen die Auswahl der untersuchten Population. Des weiteren ist die Anzahl der untersuchten Familien und Patienten von wesentlicher Bedeutung.

5.2 Assoziation zwischen genetischen Varianten im IL4R und Atopie

Zahlreiche Autoren untersuchten Assoziationen zwischen IL4R-SNPs und verschiedenen Erkrankungen (Tab. 3). Positive Ergebnisse sind nur in wenigen Studien repliziert worden. Eine zentrale Rolle im Design von Assoziationsstudien spielt die Definition des Phänotyps.

5.2.1 Definition atopischer Phänotypen

In dieser Arbeit dienten zur Feststellung eines atopischen Phänotyps bei 158 Blutspendern anamnestische und laborchemische Parameter. Die Messung von Gesamt-IgE und spezifischem IgE in Kombination mit einer standardisierten Anamnese stellt eine reliable und valide Methode zur Erhebung des Atopie-Phänotyps dar (Eriksson NE, 1990). Ca. 43% wurden als Atopiker identifiziert (Gesamt-IgE >100 kU/l oder spezifisches IgE gegen die

häufigsten Aeroallergene). Diese Zahl wird durch andere Studien bestätigt, in denen die Prävalenz von Atopie in westlichen Industrieländern untersucht wurde (Cline MG, Burrows B, 1989. Von Mutius E et al., 1994. Shirakawa T et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer positiven Atopieanamnese und erhöhtem Gesamt-IgE-Spiegel ($p < 0,001$) sowie positivem SX1-Test ($p < 0,001$). Des weiteren findet sich bei Atopikern mit positivem SX1-Test auch eine positive Familienanamnese ($p = 0,004$). Das hier eingesetzte Verfahren zur Phänotypisierung erwies sich daher als verlässliche Grundlage für die genetischen Assoziationsstudien.

5.2.2 IL4R-Genotypisierung und IL4R-Allelfrequenzen

Die IL4R-Genotypisierung durch ein neu entwickeltes SSP-PCR-Verfahren erwies sich als einfache und reliable Methode zum Nachweis der IL4R-SNPs. Die Genotypisierung wurde durch DNA-Sequenzierung, die zu 100% mit den PCR-SSP-Ergebnissen übereinstimmte, validiert. Es ergaben sich IL4R-Allelfrequenzen, die in anderen kaukasischen Studien ähnlich angegeben wurden (Tab. 25). Die von Kruse S et al. (1999b) in einer deutschen Population (Freiburg) untersuchten Allelfrequenzen der IL4R-SNPs E375A, C406R, S478P und Q551R stimmen mit denen in dieser Arbeit überein. In einer holländischen Population (Amsterdam) ergab sich bei den untersuchten Varianten I50V, E375A, C406R, S478P und Q551R ebenfalls eine deutliche Übereinstimmung (Koppelman GH, 2001. Howard TD et al., 2002). Ober C et al. (2000a) untersuchten IL4R-SNPs in unterschiedlichen Populationen; in Hutterites (einer europäischen Gründerpopulation in Kanada) und in ethnisch differenten (Afroamerikaner, Kaukasier, Spanier) CSGA-Populationen (Collaborative Study on the Genetics of Asthma, 1997).

Tab. 25: IL4R-Allelfrequenzen (in %) verschiedener Populationen

IL4R-SNP	Hutterites	CSGA-Familien			Freiburg	Amsterdam	Gießen
		Afro-Amerikaner	Kaukasier	Spanier			
I50	51,8	43,6	49,6	k.A.	k.A.	53	56,01
V50	48,2	56,4	50,4	k.A.	k.A.	47	43,99
E375	48,3	50,5	91,3	86,6	89,4	88	89,24
A375	51,7	49,5	8,6	13,4	10,6	12	10,76
C406	87,4	92,9	91,1	88,4	91,1	88	89,24
R406	12,6	7,1	8,6	11,6	8,9	12	10,76
S411	93,4	97,1	93,6	k.A.	k.A.	k.A.	97,47
L411	6,6	2,9	6,4	k.A.	k.A.	k.A.	2,53
S478	79,3	65,2	80,2	85,7	84,5	84	84,49
P478	20,7	34,8	19,7	14,3	15,5	16	15,51
Q551	73,5	40,8	83,4	76,8	79,1	80	82,9
R551	26,5	59,2	16,6	23,2	20,9	20	17,1
S761	99,1	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	100
P761	0,009	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	0

Die Allelfrequenzen unterscheiden sich in den verschiedenen Populationen. Am deutlichsten zeigen sich diese Unterschiede zwischen den Afroamerikanern und den Kaukasiern (siehe Tab. 25). Dagegen sind die Frequenzen in den untersuchten Populationen aus Freiburg (Kruse S et al., 1999), Amsterdam (Koppelman GH, 2001) und Gießen nahezu identisch. Die Übereinstimmungen der hier ermittelten Allelfrequenzen mit denen anderer Studien untermauern die Reliabilität des entwickelten Genotypisierungsverfahrens.

5.2.3 IL4R-Haplotypen

Die systematische Kartierung von SNPs im menschlichen Genom führte zur Entdeckung der Haplotyp-Blockstruktur (Daly MJ et al., 2001. Gabriel SB et al., 2002). Die meiotische Rekombination findet dabei an so genannten *hot spots* im Genom statt. Eine Trennung von Varianten innerhalb eines Blockes durch meiotische Rekombination ist daher sehr unwahrscheinlich. Diese Varianten werden in der Folge zusammen vererbt, so dass Kopplungsungleichgewichte entstehen. Bei Vorliegen mehrerer SNPs ist mit berechenbarer Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen eines bestimmten Haplotyps zu schließen. Die bisher identifizierten Haplotypblöcke erstrecken sich über 5-100 KB und zeigen nur wenige Rekombinationen (Gabriel SB et al., 2002). In den dazwischen liegenden *hot spots* ereigneten

sich fast alle Rekombinationsereignisse in der Populationsgeschichte. Zukunftsziel ist die Konstruktion einer Haplotypkarte des humanen Genoms (Couzin J, 2002), die genomweite Assoziationsstudien zu komplexen Erkrankungen erleichtern könnte (Johnson GC et al., 2001).

In dieser Arbeit erfolgte nach Ermittlung der Kopplungsungleichgewichte aller bekannten, nicht-synonymen IL4R-SNPs und auf der Basis eines *Expectation- Maximization*-Algorithmus erstmals eine Haplotypkartierung von IL4R (Tab. 14). Insgesamt konnten 11 putative IL4R-Haplotypen berechnet werden, wovon vier Haplotypen mit einer kumulativen Frequenz >90% identifiziert wurden (Tab. 14). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zwischen dem Genabschnitt, der für die extrazelluläre Domäne und dem Genabschnitt, der für die intrazelluläre Domäne des Rezeptormoleküls kodiert, ein Rekombinations- *hot spot*, so dass das IL4R-Gen zwei Haplotypblöcke enthält. Diese Tatsache ist von entscheidender Bedeutung in der Beurteilung der bisher durchgeführten Assoziationsstudien, in denen die Gene dieser beiden Haplotypblöcke als unabhängig vererbte Gene erscheinen.

Ober C et al. (2000) untersuchten die Allelfrequenzen von IL4R-Haplotypen in verschiedenen ethnischen Populationen. Es fanden sich 16 verschiedene Haplotypen, wobei acht in allen drei Gruppen (Hutterites, Afroamerikaner, Kaukasier) vorkamen. Da das P761-Allel sehr selten in der Population der Hutterites vertreten war (0,009%) wurde es in die Berechnung der Haplotypen nicht miteinbezogen. Der häufigste Haplotyp in der Gruppe der Hutterites und der Kaukasier war der Haplotyp 111111 (I50, E375, C406, S411, S478, Q551). Der zweithäufigste war der Haplotyp 211111, der sich durch ein Valin auf Position 50 unterscheidet. Der erste Haplotyp erreichte bei den Hutterites eine Häufigkeit von 46,6%, der zweite eine Häufigkeit von 29,2%. In der Gruppe der Kaukasier waren die Häufigkeiten dieser beiden Haplotypen nahezu gleich (38,2% und 37,6%). In der Gruppe der Afroamerikaner dagegen war der Haplotyp 211111 am häufigsten (19,4%) und der Haplotyp 111111 am zweithäufigsten (12,9%). Die Haplotypenhäufigkeit in der Gruppe der Afroamerikaner unterschied sich deutlich von den vorgenannten Gruppen.

Tab. 26: Frequenz (in %) der IL4R-Haplotypen

IL4R-Haplotyp	Gießen	Ober C et al., 2000		
		Hutterites	Kaukasier	Afroamerikaner
IL4R*01	49,663	46,6	38,2	12,9
IL4R*02	32,602	29,2	37,6	19,4
IL4R*03	6,441	8,4	2,4	0
IL4R*04	3,994	3,5	4,1	7,4
IL4R*05	2,228	2,3	2,9	11,1
IL4R*06	2,185	5,1	5,3	0
IL4R*07	1,480	0	0	6,4
IL4R*08	0,414	-	-	-
IL4R*09	0,346	0,2	0,6	2,8
IL4R*10	0,325	0	0,6	0
IL4R*11	0,322	0	2,9	1,8

Die putativen Haplotypen der vorliegenden Arbeit finden ihre Bestätigung, bis auf IL4R*08 mit der Sequenz 1111221, in der Studie von Ober C et al. (2000). Jedoch unterscheidet sich die Häufigkeitsverteilung (Tab. 26). Die Haplotypen IL4R*01 (111111) und IL4R*02 (211111) sind auch in der Gießener Population die häufigsten (49,7% und 32,6%) und stimmen größtenteils mit den Frequenzen der Hutterites und der Kaukasier (46,6% und 29,2% bzw. 38,2% und 37,6%) überein.

Die Übereinstimmung der hier ermittelten IL4R-Haplotypen mit denen der Segregationsanalysen untermauern die Reliabilität des benutzten *Expectation- Maximization*-Algorithmus.

5.2.4 Assoziation zwischen IL4R-SNPs und Atopie

In den letzten Jahren sind zahlreiche kontroverse Studien über die genetische Assoziation von SNPs im IL4R-Gen mit Atopie-Phänotypen publiziert worden (Gessner A, Röllinghoff M, 2000. Shirakawa I et al., 2000). Die hier durchgeführten Analysen zeigen, dass keiner der untersuchten IL4R-Polymorphismen signifikant mit Atopie oder spezifischer Sensibilisierung gegen die häufigsten Inhalationsallergene assoziiert ist. Dagegen kann bei allen mutierten IL4R-Allelen ein Trend zu niedrigeren Gesamt-IgE-Werten nachgewiesen werden. Signifikant ist diese Assoziation bei den Varianten A375, R406 und P478, allerdings nur in der Gruppe der Nicht-Atopiker (n= 90). Die Ursache dafür könnte in der größeren Varianz der IgE-Spiegel in der kleineren Atopiker-Gruppe (n= 68) liegen.

Die meisten Assoziationsanalysen wurden mit den IL4R-Varianten Q551R und I50V durchgeführt. Tabelle 27 gibt einen Überblick über die Studien zur genetische Assoziation von R551 mit Atopie-Phänotypen.

Tab. 27: Studien zur genetischen Assoziation von R551 mit Atopie-Phänotypen.

Autor	Population	Phänotyp	Probanden	Assoziation	p- Wert
Hershey GK et al., 1997	Amerikaner	Hyper-IgE-Syndrom	3	ja	0,001
		Atopie	20	ja	
Grimbacher B et al., 1998	Amerikaner	Hyper-IgE-Syndrom	20	nein	0,002
Mitsuyasu H et al., 1999	Japaner	Asthma	200	nein	
Tan EC et al., 1999a	Singapurer	Atopie	133	nein	
Malerba G et al., 1999	Italiener	Atopie	1083	nein	
Kruse S et al., 1999b	Deutsche	IgE	181	ja	
Noguchi E et al., 1999a	Japaner	Spez. Sensibilisierung		nein	0,3
		Atopie	361	nein	
Rosa-Rosa L et al., 1999	Amerikaner	Asthma	149	ja	
Patuzzo C et al., 2000	Italiener	Asthma	851	nein	
Takabayashi A et al., 2000	Japaner	Asthma	100	nein	
Oiso N et al., 2000	Japaner	Atopische Dermatitis	27	ja	0,01
Rogala B et al., 2001	Polen	Atopie	44	nein	
Haagerup A et al., 2001	Dänen	Atopie	424	nein	
Howard TD et al., 2002	Dänen	Gesamt- IgE	200	nein	
Wjst M et al., 2002	Deutsche	Asthma	415	nein	
	Schweden				

Aufgrund geringer Probandenzahlen in den Studien von Hershey K et al. (1997) und Oiso N et al. (2000) sind die Ergebnisse der positiven Assoziation zwischen R551 und atopischer Dermatitis kritisch zu bewerten.

Bei drei von insgesamt drei Patienten mit dem Hyper-IgE-Syndrom fanden Hershey K et al. (1997) das R551-Allel. Eine Beziehung dieser Mutation zum Hyper-IgE-Syndrom konnte von Grimbacher B et al. (1998) dagegen nicht bestätigt werden. In deren Studie tragen nur vier von zwanzig Patienten die R551-Mutation (Allelfrequenz von 10%). Diese Allelfrequenz unterschied sich nicht signifikant von der Frequenz der Kontrollgruppe (12%, n=25). Auch hier sind die Daten aufgrund der geringen Fallzahlen kritisch zu sehen.

Eine Assoziation von R551 zum allergischen Asthma konnten mehrere unabhängige Arbeitsgruppen mit größeren Probandenzahlen in ethnisch verschiedenen Populationen (Japaner, Italiener, Deutsche, Schweden) nicht bestätigen (Mitsuyasu H et al., 1999. Takabayashi A et al., 2000. Patuzzo C et al., 2000. Wjst M et al., 2002).

Ebenfalls keinen Einfluss dieser Variante auf die Vererbung von Atopie und Asthma zeigten Assoziationsstudien in Singapur, Italien, Japan, Polen und Dänemark (Tan EC et al., 1999.

Malerba G et al., 1999. Noguchi E et al., 1999. Rogala B et al., 2001. Haagerup A et al., 2001).

Das Gesamt-IgE wurde von R551 in der Studie von Howard TD et al. (2002) nicht beeinflusst. Kruse S et al. (1999b) dagegen berichteten von einer Assoziation der Polymorphismen R551 und P478 zu niedrigeren Gesamt-IgE-Werten. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten der vorliegenden Arbeit überein; bei allen untersuchten IL4R-Varianten liegt ein Trend zu niedrigeren IgE-Werten vor. Im Widerspruch dazu stehen die Studienergebnisse von Hershey K et al. (1997), die eine Assoziation zu erhöhten IgE-Werten im Rahmen des Hyper-IgE-Syndroms fanden.

Die Allelfrequenzen der Varianten R551 (20,9%) und P478 (15,5%) bei Kruse S et al. (1999b) korrespondieren ebenfalls mit denen der vorliegenden Arbeit (R551: 17,1%, P478: 15,51%). Die Probandenzahlen von Kruse S et al. (1999b) und der vorliegenden Arbeit sind zudem miteinander vergleichbar (n= 181 vs. n= 158). Des weiteren konnten Kruse S et al. (1999b) eine Kopplung zwischen diesen beiden IL4R-Varianten nachweisen (76% der R551-Träger sind ebenfalls P478-Träger, umgekehrt tragen 95% der P478-Träger das R551-Allel). Eine Kopplung zwischen diesen beiden SNPs bestätigt sich auch in der vorliegenden Arbeit (Tab. 13). Besonders deutlich wurde bei Kruse S et al. (1999b) die Assoziation zu niedrigeren IgE-Werten, wenn beide Varianten zusammen auftraten ($p < 0.0008$), so dass eine funktionelle Interaktion beider polymorpher Positionen postuliert wurde.

Die Arbeitsgruppe Wjst M et al. (2002) konnte zwar keinen signifikanten Einfluss von R551 auf die Gesamt-IgE-Werte finden, stellte aber eine leicht verminderte Prävalenz des R551-Allels bei asthmatischen Kindern fest ($p = 0,044$).

Die Ergebnisse von Kruse S et al. (1999b) und von Wjst M et al. (2002) untermauern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Der IL4R-SNP I50V verursacht einen Aminosäureaustausch im extrazellulären Teil der humanen IL-4R α -Kette. Die Tabelle 28 gibt einen Überblick über die Studien zur genetischen Assoziation von I50 mit Atopie-Phänotypen.

Tab. 28: Studien zur genetischen Assoziation von I50 mit Atopie-Phänotypen

Autor	Population	Phänotyp	Probanden	Assoziation	p- Wert
Mitsuyasu H et al., 1998	Japaner	Asthma- Erwachsene	120	ja	<0,001
		Kinder	120	ja	<0,0001
		IgE	240	ja	<0,00001
Noguchi E et al., 1999b	Japaner	Atopie	375	nein	
Tan EC et al., 1999b	Singapurer	Atopie	133	nein	
Takabayashi A et al., 2000	Japaner	Asthma	100	ja	0,044
Oiso N et al., 2000	Japaner	Atopische Dermatitis	27	nein	
Haagerup A et al., 2001	Dänen	Atopie	424	nein	
Mujica-Lopez KI et al., 2002	Mexikaner	Atopische Dermatitis	30	nein	
Howard TD et al., 2002	Dänen	Gesamt- IgE	200	nein	
Wjst M et al., 2002	Deutsche Schweden	Asthma	415	nein	

Mitsuyasu H et al. (1998, 1999) wiesen in einer japanischen Population eine deutliche Assoziation zwischen dem Wildtyp I50 und Atopie bzw. erhöhten IgE-Werten nach. In der vorliegenden Arbeit wurde beim Wildallel ebenfalls die Tendenz zu höheren IgE- Werten festgestellt (Tab. 16). Diese Daten sind vermutlich aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Atopiker (n=68) nicht signifikant. Mitsuyasu H et al. (1998, 1999) untersuchten insgesamt 240 Asthmatiker. In einer weiteren japanischen Studie (Takabayashi A et al., 2000) konnte ebenfalls eine Assoziation zwischen I50 und Asthma nachgewiesen werden. Besonders deutlich zeigte sich diese Assoziation bei Kindern, bei denen die asthmatischen Beschwerden schon innerhalb der ersten zwei Lebensjahre begonnen haben und bei Kindern mit stark ausgeprägtem Asthma. Dieses Ergebnis könnte sich durch die Hypothese erklären, dass Asthmaformen mit frühem zeitlichen Beginn und starker körperlicher Beeinträchtigung vermutlich einen ausgeprägteren genetischen Hintergrund aufweisen als schwächere Formen und solche mit späterem Beginn. Bei letzteren könnte dagegen der Einfluss von Umweltfaktoren eine größere Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit sind lediglich Erwachsene untersucht worden, so dass eine mögliche Assoziation zwischen den IL4R-SNPs und Atopie keine deutliche Signifikanz erreicht.

Im Widerspruch zu den Ergebnissen der japanischen Studien von Mitsuyasu H et al. (1998, 1999) und Takabayashi A et al. (2000) stehen die Daten von Noguchi E et al. (1999). Diese japanische Gruppe konnte in einer *affected sib-pair* Studie mittels vier IL4R-flankierenden Mikrosatelliten-Markern keine signifikante Kopplung mit asthmatischem und atopischem Phänotyp nachweisen.

Studien in anderen ethnischen Populationen zeigten ebenfalls keine Assoziation zwischen IL4R-SNPs und Atopie, atopischer Dermatitis, allergischem Asthma bzw. Gesamt-IgE-Werten (Tab. 28).

Weitere Studien zur genetischen Assoziation von IL4R-SNPs mit Atopie-Phänotypen wurden mit den Varianten E375, C406, S478 bzw. P761 durchgeführt. Diese Ergebnisse sind ebenfalls uneinheitlich (Tab. 3).

Wjst M et al. (2002) konnten für diese SNPs keine Assoziation zu allergischem Asthma nachweisen. In einer mexikanischen Studie mit 30 Kindern wurde für die Varianten E375A und C406R ebenfalls keine Assoziation mit atopischer Dermatitis oder Gesamt-IgE-Werten festgestellt (Mujica- Lopez KI et al., 2002).

Dagegen fanden Howard TD et al. (2002) eine Assoziation zwischen den Wildallelen E375, C406 und S478 zu erhöhten Gesamt-IgE-Werten ($p=0,02$ bzw. $0,01$ bzw. $0,0007$). Eine Häufung von S478 bei bronchialer Hyperreagibilität bzw. Asthma ($p=0,02$ bzw. $0,04$) war ebenfalls feststellbar. Diese Assoziation bestätigt den in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Trend der mutierten IL4R-SNPs zu niedrigeren IgE-Werten. Die Korrespondenz zwischen den Allelfrequenzen der Studie von Howard TD et al. (2002) [bzw. Koppelman GH, 2001] und denen der vorliegenden Studie bestätigt die Vergleichbarkeit der Daten (siehe Tab. 25).

Für die Variante P761 konnten Andrews RP et al. (2001) eine Assoziation zum allergischen Asthma nachweisen. Diese Arbeitsgruppe fand in der Gesamtpopulation (Asthmatiker und Kontrollpersonen, $n= 249$) eine P761-Frequenz von 1,8%. Da in der vorliegenden Arbeit keiner der Probanden P761 aufwies, wurde diese Mutation nicht in die weiteren Analysen einbezogen. Auch in anderen Studien konnten nur wenige bis keine P761-Träger festgestellt werden (Ober C et al., 2000. Mujica- Lopez KI et al., 2002). Aufgrund der sehr geringen Populationsfrequenz von P761 und der im Vergleich dazu kleinen Probanden- ($n= 196$) und Kontrollgruppe ($n= 53$) in der Studie von Andrews RP et al. (2001), sind diese Daten kritisch zu bewerten.

Durch die Tatsache, dass sich die nicht-synonymen SNPs in dem für den intrazellulären Bereich kodierenden Genabschnitt fast komplett im Kopplungsungleichgewicht zueinander befinden, ist es kaum möglich, die für die Beeinflussung der Rezeptorfunktion maßgebliche Variante bzw. Varianten-Kombination zu identifizieren. Risma KA et al. (2002) zeigten, dass die Assoziation von R551 zum allergischen Asthma erst in der Kombination mit V50 hochsignifikant ist. Kruse S et al. (1999b) konnten bei Personen mit den beiden Varianten

R551 und P478 besonders geringe Gesamt-IgE-Werte ($p < 0.0008$) nachweisen. Demnach kann ein einzelner *single nucleotide polymorphism* nicht für eine Assoziation allein verantwortlich gemacht werden. Vielmehr sind die in einem bestimmten Haplotyp miteinander gekoppelten SNPs im Zusammenhang mit einer festgestellten Assoziation zu betrachten.

5.3 Assoziation von IL4R-SNPs mit Multipler Sklerose

5.3.1 IL4R-Allelfrequenzen

Die Untersuchung der IL4R-SNPs bei Multipler Sklerose erfolgte aufgrund der Hypothese, dass ein Aminosäureaustausch im IL-4R zu einer Hemmung oder Verstärkung des Signals mit nachfolgendem Einfluss auf die Immunantwort führt. Eine Hemmung der Signaltransduktion (verminderte IgE-Spiegel, verminderte CD23-Expression) könnte einen *Shift* in Richtung Th1-Immunantwort bewirken. Bestimmte Varianten müssten folglich bei Multiple Sklerose-Patienten gehäuft vorkommen. Zur Überprüfung dieser Hypothese erfolgte eine explorative Studie der IL4R-Allelfrequenzen bei Multiple Sklerose-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Die Genotypisierung bei den ersten 100 MS-Patienten ergab eine Überrepräsentation der R551-Variante ($p=0,025$) und, im geringeren Ausmaß, der L411-Variante im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe ($n=305$). Die Replikation bei weiteren 241 MS-Patienten konnte eine signifikante Häufung dieser beiden Varianten allerdings nicht bestätigen. Nach Stratifizierung aller Patienten in die drei häufigsten klinischen Formen zeigte sich ein signifikantes Überwiegen des R551-Allels bei PPMS-Patienten gegenüber den Kontrollpersonen ($p=0,018$). Bei der primär progressiven Form der MS (PPMS) wird die Bedeutung der genetischen Beteiligung im Vergleich zu den anderen MS-Formen durch eine strenge Konkordanz bei Geschwisterpaaren besonders deutlich (Robertson CF et al., 1996b). Diese Tatsache könnte die Überrepräsentation der R551-Variante bei PPMS-Patienten im Vergleich zu den anderen MS-Formen erklären. Dennoch stellt R551 im allgemeinen keinen generellen genetischen Risikofaktor für die Entwicklung einer MS dar, beeinflusst aber möglicherweise die Prädisposition für PPMS. In der vorliegenden Untersuchung fand sich die höchste Prävalenz von R551-Trägern bei PPMS-Patienten. Im allgemeinen besteht eine generelle Übereinstimmung über die schlechte Prognose der PPMS und die signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Epidemiologie, des Musters der ZNS-Beteiligung und der

therapeutischen Ansprechbarkeit im Vergleich zu anderen klinischen Formen (Thompson AJ et al., 1997).

5.3.2 Assoziation der IL4R-SNPs mit MOG-Autoantikörpern

Bis jetzt existiert kein einheitliches Konzept, welches die Immunpathologie der MS als Ergebnis isolierter Th1-vermittelter Gewebeerstörung erklärt (Wekerle H, 1999). Es gibt Tiermodelle der EAE, die eine primär antikörpervermittelte Genese vermuten lassen (Adelmann M et al., 1995. Lafaille JJ et al., 1997). Untersuchungen von Genain CP et al. (1999) und Storch MK et al. (1998b) zeigten, dass MOG-Autoantikörper für die Demyelinisierung der MS-Plaques und EAE-Läsionen verantwortlich sind. Diese Daten werden durch die Tatsache untermauert, dass MOG-spezifische T-Zellen bei MS-Patienten wesentlich häufiger vorkommen als bei gesunden Menschen (Kerlero de Rosbo N et al., 1997. Wallström E et al., 1998). Neben den MOG-Autoantikörpern sind auch Antikörper gegen andere Myelinproteine wie MBP, 2'3'-zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase und Oligodendroglia-Proteine von pathogenetischer Bedeutung (Archelos JJ et al., 2000). Trotz dieser eingeschränkten Aussagefähigkeit ist es interessant, dass MOG-Autoantikörper bei R551-Trägern gehäuft vorkommen. Jedoch erfüllt diese Tatsache nach Bonferroni-Korrektur keine stringenten statistischen Kriterien.

5.3.3 HLA-DRB1*15-Stratifizierung

Eine konsistente Kopplung, die sich in vier unabhängigen genomweiten Analysen von Multiplex-Familien zeigte, besteht nur zum MHC auf Chromosom 6p21 (Haines JL et al., 1996. Sawcer S et al., 1996. Ebers GC et al., 1996. Kuokkanen S et al., 1997). Weitere Studien ergaben eine Assoziation der MS mit dem HLA-DRB1*1501, DQB1*0602-Haplotyp (Olerup O, Hillert J, 1991. Corradu F et al., 1998. Weinshenker BG et al., 1998). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine Stratifizierung der MS-Patienten in HLA-DRB1*15-positive und -negative Patienten durchgeführt. Es zeigte sich eine Prävalenz von HLA-DRB1*15-positiven MS-Patienten von 56,9% (von insgesamt 341 MS-Patienten). Diese Frequenz stimmt mit den Frequenzen von Corradu F et al., 1998 (61%, 227 MS-Patienten), Olerup O und Hillert J, 1991 (63%, 179 MS-Patienten) und Epplen C et al., 1997 (56,4%, 358 MS-Patienten) überein und bestätigt somit die Vergleichbarkeit der Daten. Die Frequenz von DRB1*15-positiven gesunden Knochenmarkspendern (n=423) liegt dagegen bei ca. 33,6% (Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin Gießen).

Insgesamt zeigte sich in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation zwischen IL4R-Varianten oder HLA-DRB1*15 mit den Hauptgruppen der MS. Ein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung von IL4R-Varianten bei HLA-DRB1*15-positiven und -negativen Patienten konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Allerdings schließt dies nicht die Möglichkeit aus, dass IL4R-Varianten nicht doch für den Krankheitsverlauf von Bedeutung sind. Da die den Krankheitsverlauf definierende EDSS, nach der die MS-Patienten in dieser Arbeit eingeteilt worden sind, nicht linear skaliert ist und durch mangelnde Objektivität nur eine geringe Reliabilität besteht, stellt die Progressionsrate (EDSS/Krankheitsdauer) eine recht ungenaue Maßeinheit der Krankheitsschwere dar. Insbesondere Patienten mit einem EDSS von 6-6,5 können jahrelang auf diesem Wert verbleiben, obwohl doch eine signifikante klinische Progression der Erkrankung ersichtlich ist.

5.4 Assoziation von IL4R-SNPs mit anderen Krankheiten

In der Organtransplantation konnte kürzlich mittels Kaplan-Meier-Analyse in einer Gruppe von 156 nierentransplantierten Patienten eine Assoziation von R551 mit einem verringertem Transplantatüberleben festgestellt werden (Hackstein H et al., 1999).

Tab. 29: Assoziationsstudien zwischen IL4R-SNPs und anderen Erkrankungen

IL4R-SNP	Autor	Population	Phänotyp	Probanden	Assoziation
R551	Hackstein H et al., 1999	Deutsche	Nierentransplantat-abstoßung	156	ja
R551/ I50	Kanemitsu S et al, 1999	Japaner	System. Lupus erythematodes	50	ja
			<i>Insulin dependent diabetes mellitus</i>	54	nein
R551	Parry RG et al, 1999	Briten	<i>Minimal change nephropathy</i>	149	nein
R551	Youn J et al., 2000	Koreaner	SLE	155	ja
			Sjögren Syndrom	45	ja
			System. Sklerodermie	19	ja
			Rheumatoide Arthritis	57	nein
R551	Daley T et al., 2001	Amerikaner	Kutane Mastozytose	36	ja

Da in der Studie von Kanemitsu S et al. (1999) R551 und I50 bei SLE-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden häufiger vorkommen ($p=0,016$, bzw. $p= 0,0057$), wurde eine gesteigerte IL-4-Rezeptorfunktion durch diese Varianten postuliert. Dadurch würde ein Th2-

dominantes Milieu erzeugt, dass zu einer Autoantikörperproduktion führt. Eine weitere Assoziation der R551-Variante zum SLE ($p=0,001$) konnten Youn J et al. (2000) nachweisen. R551 war in den funktionellen Analysen mit einer gesteigerten Expression von CD23 bei den SLE-Patienten assoziiert. Eine weitere Assoziation zeigte sich auch zur Progressiven systemischen Sklerodermie ($p=0,031$) und zum Sjögren Syndrom ($p=0,035$).

Die Studie von Daley T et al. (2001) zeigte eine Assoziation von R551 zur milderen, kutan limitierten Form der Mastozytose im Vergleich zur Mastozytoseform mit Knochenmarkbeteiligung ($p<0,001$). Da die unphysiologische Vermehrung von Mastzellen durch IL-4 gebremst werden kann, wurde eine signalverstärkende Funktion der R551-Variante auf den IL-4 Rezeptor postuliert (Daley T et al., 2000).

Im Rahmen des Th1/Th2-Modells stellt die Multiple Sklerose eine Th1-Erkrankung dar (Del Prete G, 1998). Andere Erkrankungen wie der Systemische Lupus erythematoses und die Progressive systemische Sklerodermie zeigen eine weniger deutliche Th1/Th2-Polarisierung (Del Prete G, 1998). Insgesamt zeigen die Studien, dass IL4R-SNPs vermutlich einen Einfluss auf das Th1/Th2-Gleichgewicht ausüben, wobei die genauen pathogenetischen Mechanismen noch ungeklärt sind.

5.5 Populationsgenetische Effekte in Assoziationsanalysen

In verschiedenen ethnischen Populationen zeigen sich Unterschiede in der Frequenz der IL4R-Haplotypen, der IL4R-Varianten sowie in deren Assoziation zur Atopie.

Wu X et al. (2001) haben die Region um Exon 12 des IL4R-Gens in drei ethnisch unterschiedlichen Populationen (n je 12) sequenziert und insgesamt vierundzwanzig SNPs identifiziert. Darunter waren neben den schon bekannten sieben nicht-synonymen SNPs zwei weitere nicht-synonyme (V554I, P650S) und zwei synonyme SNPs. Dreizehn Punktmutationen befinden sich in Exon 12, elf weitere Mutationen in der nicht-kodierenden Umgebung. Die Verteilung dieser SNPs in den verschiedenen Populationen ist unterschiedlich. Bei den afrikanischen Probanden fanden sich insgesamt zweiundzwanzig SNPs, darunter neun, die ausschließlich in dieser Bevölkerungsgruppe auftraten. Die europäische Population zeigte vierzehn SNPs mit zwei bevölkerungsspezifischen Mutationen. Die zehn SNPs der asiatischen Gruppe zeigten sich auch bei den afrikanischen Probanden. Die ausgeprägte genetische Variabilität und die größere Anzahl populationspezifischer Varianten bei Afrikanern im Vergleich zu Europäern und Asiaten wird auch in Studien über andere humane Gene ersichtlich (Nickerson DA et al., 1998. Goddard KA et al., 2000). Afrikanische Populationen weisen zusätzlich kleinere Haplotypblöcke auf.

Diese Daten unterstützen die *out-of-Africa*-Theorie, die eine Besiedlung Europas und Asiens von Afrika ausgehend annimmt (Freidenberg J et al., 2002). Evolutionäre Selektionsmechanismen, die zu dieser ausgeprägten Variabilität im IL4R geführt haben, sind v.a. in der Beeinflussung der Immunantwort durch Infektionen zu finden.

5.6 Epistasis bei polygenen Erkrankungen

Epistasis beschreibt die Interaktion mehrerer Genvarianten, die zu einem spezifischem Phänotyp führt. Die Analyse des Zusammenwirkens von Kandidaten-Genen für Atopie wird in Zukunft an Bedeutung zunehmen. Eine Interaktion mit Genvarianten im IL4R außerhalb der kodierenden Region und mit anderen Genvarianten im humanen Genom ist anzunehmen. Neben IL-4 wird auch IL-13 von Th2-Zellen gebildet und kann nach Allergenexposition den Immunglobulinisotypenswitch nach IgE in B-Lymphozyten induzieren. Experimente mit Mäusen zeigten die Wirkung von IL-13 in der Entstehung von Asthma unabhängig von IL-4. (Grunig G et al., 1998. Wills-Karp M et al., 1998). Da diese beiden Zytokine an eine gemeinsame Rezeptorkomponente, der IL4R α -Kette, binden, ist es wahrscheinlich, dass verschiedene Polymorphismen in den Rezeptoren wie auch in den Zytokinen von IL-4 und IL-13 einen Einfluss auf die Regulation allergischer Erkrankungen ausüben. Mehrere Polymorphismen im IL-13-Gen sind bereits mit erhöhten IgE-Werten assoziiert worden (Graves PE et al., 2000. Van der Pouw Kraan TCTM et al., 1999. Heinzmann A et al., 2000). Koppelman GH (2001) zeigte in einer holländischen Population eine signifikante Gen-Gen-Interaktion zwischen S478P im IL4R-Gen und der -1111-Promotervariation im IL13-Gen, wobei Individuen mit beiden Mutationen ein 5-fach höheres Risiko in der Asthmaentstehung zeigten als Individuen mit Wildtyp ($p=0,0004$).

Die erst kürzlich entdeckte Variante T3223, die in der Promoterregion von IL4R liegt, (Allelfrequenz 29,8 %) ist mit niedrigeren Spiegeln des löslichen IL-4R assoziiert (Hackstein H et al., 2001). Zusätzlich zeigt diese Variante eine signifikante Kopplung zu I50V, so dass beide Varianten in Kombination möglicherweise Einfluss auf die Pathogenese von Atopie nehmen könnten.

5.7 Einfluss der IL-4-Rezeptorvarianten auf die Signaltransduktion

Die Beeinflussung der Signaltransduktion durch Aminosäureaustausch im IL-4-Rezeptor konnte in verschiedenen Studien beobachtet werden (Tab. 5).

Die beiden Varianten Q551R und S478P verursachen Aminosäureaustausche an kritischen Bindungsstellen des IL-4-Rezeptors für intrazelluläre Proteine. Diese Tatsache macht eine Beeinflussung der Signaltransduktion wahrscheinlich. P478 führt nahe der Bindungsregion des I4R-Motivs zu einem Austausch von Serin nach Prolin. R551 führt zu einem Austausch von Glutamin nach Arginin in der Nähe des Tyrosinrestes auf Position 550 und könnte so möglicherweise die Bindungsspezifität des angrenzenden Tyrosinrestes zu den Signaltransduktionsmolekülen STAT6 und SHP-1 ändern (Kruse S et al., 1999; Hershey GK et al., 1997). I50V, als einzige Variante im extrazellulären Rezeptoranteil, könnte die Bindungsaffinität der IL-4R α -Kette zu IL-4 beeinflussen wie im Rahmen von Tiermodellen bereits diskutiert wurde (Schulte T et al., 1997).

5.7.1 Funktionelle Bedeutung von IL-4R-Varianten für die Signaltransduktion

Mehrere Studien zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung des Aminosäureaustausches im IL-4R wurden durchgeführt (Tab. 5). Ein zentraler Marker für die Signalweiterleitung im IL-4-Rezeptor stellt die IL-4-induzierte CD23-Expression auf der Zelloberfläche verschiedener Zellen dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die IL-4-induzierte CD23-Expression auf B-Lymphozyten in Abhängigkeit verschiedener IL4R-Genotypen ermittelt. Die Ergebnisse zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. B-Zellen von Personen mit homozygotem Wildtyp der Varianten S478P und Q551R zeigen eine wesentlich stärkere CD23-Expression nach IL-4-Exposition als B-Zellen von Personen mit heterozygoten oder homozygot mutierten Allelen (Tab. 23 und 24). Probanden mit mutiertem Allel scheinen also *Low-responder* gegenüber IL-4 zu sein (bzgl. CD23).

Diese Daten sind vereinbar mit dem in der vorliegenden Arbeit festgestelltem Trend zu niedrigeren Gesamt- IgE-Werten bei Probanden mit mutierten IL4R-Varianten und bestätigen die Ergebnisse von Kruse S et al. (1999b) sowie Ober C et al. (2000) und stehen somit im direkten Widerspruch zu den Daten von Hershey GK et al. (1997).

Die Analyse von Hershey GK et al. (1997) ergab bei homozygoten und heterozygoten R551-Trägern (n=8) im Vergleich zu Q551-Trägern eine erhöhte IL-4-induzierte CD23-Expression auf peripheren mononukleären Zellen. Postuliert wurde daher eine veränderte Bindungsspezifität des angrenzenden Tyrosinrestes durch R551, so dass der negative Regulator SHP-1 nur vermindert binden kann. Die negative Regulation wird somit geschwächt und die Signalweiterleitung verstärkt. Hershey GK et al. (1997) haben die R551-

Variante daher als *gain-of-function*-Mutation im IL-4R bezeichnet. Eine Beeinflussung der STAT6-Aktivierung durch die R551-Variante wurde nicht festgestellt.

Transfektionsversuche mit Mäusezell-Linien konnten indes keinen Einfluss der R551-Variante auf die CD23-Expression feststellen (Wang HY et al., 1999). Eine Aktivierung von STAT6- und IRS-1- Molekülen zeigte sich nicht.

Untersuchungen von Kruse S et al. (1999) zum funktionellen Einfluss der beiden Varianten R551 und P478 ergaben, dass die Phosphorylierung von JAK1 nicht beeinflusst wird. Eine Änderung der Signaltransduktion durch eine Änderung der Bindungsspezifität oder Phosphorylierungskapazität von JAK1 wurde daher ausgeschlossen. Die Phosphorylierung von IRS1-Molekülen zeigte sich dagegen bei Probanden mit beiden polymorphen Positionen stark erhöht. Diese verstärkte Phosphorylierung von IRS1-Molekülen könnte die IL-4-induzierten Signalmechanismen mindern wie es bereits für den Insulinrezeptor nachgewiesen werden konnte (Paz K et al., 1997). Die STAT6-Phosphorylierung wurde durch R551 und P478 bedingte Aminosäureaustausche reduziert.

Risma KA et al. (2002) konnten keinen Einfluss der Einzelvarianten R551 und V50 auf die CD23-Expression feststellen. Erst die Kombination der beiden Varianten V50 und R551 zeigte eine gesteigerte Expression von CD23-Molekülen, wodurch eine Funktionsbeeinflussung erst im Zusammenwirken der beiden SNPs gesehen wurde. Die Kombination von V50 und R551 erbrachte ebenfalls eine gesteigerte IL-4-induzierte Expression von IL-4R α - Molekülen.

Zur Untersuchung der I50V-Variante transfizierten Mitsuyasu H et al. (1998, 1999) die cDNA in murine und humane B-Lymphozyten-Zelllinien. Nach Stimulation mit hIL-4 zeigte sich sowohl eine gesteigerte IgE-Produktion als auch eine gesteigerte Zellproliferation bei den I50-transfizierten Zellen im Vergleich zu den V50-transfizierten Zellen. Die Ursache dafür wurde in einer verstärkten STAT6-Aktivierung durch die I50-Variante gesehen. Der Mechanismus bleibt aber weiterhin offen, da eine Veränderung der Rezeptoraffinität zu IL-4 nicht nachgewiesen werden konnte (Mitsuyasu H et al., 1998).

Ein Einfluss der Variante S761P auf die CD23-Expression oder STAT6-Aktivierung konnte nicht nachgewiesen werden (Andrews RP et al., 2001).

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abbas AK, Murphy KM, Sher A: Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793, 1996

Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassmann H, Matthieu JM, Gardinier MV, Dornmair K, Linington C: The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63: 17-27, 1995

Aman MJ, Tayebi N, Obiri NI, Puri RK, Modi WS, Leonard WJ: cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor α chain. *J Biol Chem* 271: 29265-29270, 1996

Andrews RP, Burrell L, Rosa-Rosa L, Cunningham CM, Brzezinski JL, Bernstein JA, Hershey GK: Analysis of the Ser786Pro Interleukin-4 Receptor α Allelic Variant in Allergic and Nonallergic Asthma and Its Functional Consequences. *Clinical Immunology* 100: 298-304, 2001

Antonarakis SE: Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Monenclature Working Group. *Hum Mutat* 11: 1, 1998

Archelos JJ, Storch MK, Hartung HP: The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 47: 694-706, 2000

Barcena A, Sanchez MJ, De La Pompa JL, Toribio ML, Kroemer G, Martinez AC: Involvement of the interleukin 4 pathway in the generation of functional gamma delta T cells from human pro-T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7689-7693, 1991

Barnes KC, Neely JD, Duffy DL, Freidhoff LR, Breazeale DR, Schou C, Naidu RP, Levett PN, Renault B, Kucherlapati R, Iozzino S, Ehrlich E, Beaty TH, Marsh DG: Linkage of asthma and total serum IgE concentration to markers on chromosom 12q: evidence from Afro-Caribbean and Caucasiens populations. *Genomics* 37: 41-50, 1996

Barnes KC, Marsh DG: The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* 19: 325-332, 1998

Bazan JF: Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* 11: 350-354, 1990

Bein G, Gläser R, Kirchner H: Rapid HLA-DRB1 genotyping by nested PCR amplification. *Tissue Antigens* 39: 68-73, 1992

Bein G, Hackstein H, Kluter H: DNA typing of human platelet antigen systems 1, 2, 3 and 5 in B-lymphoblastoid cell lines of the International Histocompatibility Workshop. *Tissue Antigens* 49: 443, 1997

Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J: Myelin oligodendrocyte glycoprotein: A novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75: 77-88, 1997

- Bogdan C, Nathan C: Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci* 685: 713, 1993
- Borecki IB, Rao DC, Lalouel JM, McGue M, Gerrard JW.: Demonstration of a common major gene with pleiotropic effects on immunoglobulin E levels and allergy. *Genet Epidemiol* 2: 327-338, 1985
- Boulay JL, Paul WE: The interleukin-4-related lymphokines and their binding to hematopoietin receptors. *J Biol Chem* 267: 20525-20528, 1992
- Brehm U, Piddlesden SJ, Gardinier MV, Linington C: Epitope specificity of demyelination monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol* 97: 9-15, 1999
- Caput D, Laurent P, Kaghad M, Lelias J-M, Lefort S, Vita N, Ferrara P: Cloning and characterization of a specific interleukin (IL-) 13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor α chain. *J Biol Chem* 271:16921-16926, 1996
- Casolaro V, Georas SN, Song ZM, Ono SJ: Biology and genetics of atopic disease. *Curr Opin Immunol* 8: 796, 1996
- Chataway J, Feakes R, Coraddu F, Gray J, Deans J, Fraser M, Robertson N, Broadley S, Jones H, Clayton D, Goodfellow P, Sawcer S, Compston A: The genetics of multiple sclerosis: principles, background and updated results of the United Kingdom systematic genome screen. *Brain* 121:1869-87, 1998
- Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL: Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265: 1237, 1994
- Chen XH, Patel BK, Wang LM, Frankel M, Ellmore N, Flavell RA, LaRoche WJ, Pierce JH: Jak 1 expression is required for mediating interleukin-4-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate and Stat6 signaling molecules. *J Biol Chem* 272: 6556, 1997
- Choi P, Reiser H: IL-4: role in disease and regulation of production. *Clin Exp Immunol* 113: 317, 1998
- Chomarat P, Banchereau J: An update on interleukin-4 and its receptor. *Eur Cytokine Netw* 8: 333-344, 1997
- Cline MG, Burrows B: Distribution of allergy in a population sample residing in Tucson, Arizona. *Thorax* 44: 425-431, 1989
- Coffman RL, Varkila K, Scott P, Chatelain R: Role of cytokines in the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets in vivo. *Immunol Rev* 123: 189-207, 1991
- Collaborative Study on the Genetics of Asthma (CSGA): A genomewide search for asthma susceptibility loci in ethnically diverse populations. *Nat Genet* 15: 389-392, 1997
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A: Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261: 472-475, 1993

Constant SL, Bottomly K: Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15: 297-322, 1997

Cookson WOCM, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Julier C, Le Souëf PN, Nakamura Y, Lathrop GM, Hopkin JM: Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11q. *Lancet* 340: 381-384, 1992

Cookson WOMC: Genetic factors in asthma. *Adv Exp Med Biol* 409:55-60, 1996

Cookson W: The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature* 402: B5-B11, 1999

Coraddu F, Sawcer S, Feakes R, Chataway J, Broadley S, Jones HB, Clayton D, Gray J, Smith S, Taylor C, Goodfellow PN, Compston A: HLA typing in the United Kingdom multiple sclerosis genome screen. *Neurogenetics* 2: 24-33, 1998

Corrigan CJ, Hartnell A, Kay AB: T lymphocyte activation in acute severe asthma. *Lancet* 1:1129-1132, 1988

Cosman D: The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine* 5: 95-106, 1993

Couzin J: Genomics. New mapping projects splits the community. *Science* 296: 1391-1393, 2002

Daley T, Metcalfe DD, Akin C: Association of the Q576 R polymorphism in the interleukin-4 receptor alpha chain with indolent mastocytosis limited to the skin. *Blood* 98: 880-882, 2001

Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES: High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 29: 229-232, 2001

Daniels SE, Bhattacharya S, James A, Leaves NI, Young A, Hill MR, Faux JA, Ryan GF, Le Souëf PN, Lathrop GM, Musk AW, Cookson WOCM: A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. *Nature* 383: 247-250, 1996

Dean G, McLoughlin H, Brady R, Adelstein A, Tallett-Williams J: Multiple sclerosis among immigrants in Greater London. *Brit Med J* 1: 861-864, 1976

Defrance T, Aubry JP, Rousset F, Vanbervliet B, Bonnefoy JY, Arai N, Takebe Y, Yokota T, Lee F, Arai K, deVries J, Banchereau J: Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes. *J Exp Med* 165: 1459-1467, 1987

Defrance T, Carayon P, Billian G, Guillemot JC, Minty A, Caput D, Ferrara P: Interleukin 13 is a B cell stimulatory factor. *J Exp Med* 179: 135-143, 1994

Deichmann K, Bardutzky J, Forster J, Heinzmann A, Kuehr J: Common polymorphisms in the coding part of the IL-4 receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 696-697, 1997

Deichmann KA, Heinzmann A, Forster J, Dischinger S, Mehl C, Brueggelente E, Hildebrandt F, Moseler M, Kuehr J: Linkage and allelic association of atopy and markers flanking the IL4-receptor gene. *Clin Exp Allergy* 28: 151- 155, 1998

Del Prete G, Maggi E, Parronchi P, Chretien I, Tiri A, Macchia D, Ricci M, Banchereau J, De Vries J, Romagnani S: IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J Immunol* 140: 4193-4198, 1988

Del Prete G: The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int Rev Immuno* 16: 427- 455, 1998

Demeure CE, Yang LP, Byun DG, Ishihara H, Vezzio N, Delespesse G: Human naive CD4 T cells produce interleukin-4 at priming and acquire a Th2 phenotype upon repetitive stimulations in neutral conditions. *Eur J Immunol*. 25:2722- 2725, 1995

Dempster A, Laird N, Rubin N: Maximum likelihood estimation from incomplete data via the EM algorithm. *J Roy Statist Soc* 39: 1, 1977

Deutsch HH, Kortnitz K, Chung J, Kalthoff FS: Distinct sequence motifs within the cytoplasmatic domain of the human IL-4 receptor differentially regulate apoptosis inhibition and cell growth. *J Immunol* 154: 3696, 1995

Dizier MH, Hill M, James A, Faux J, Ryan G, le Souef P, Lathrop M, Musk AW, Demenais F, Cookson W: Decetion of a recessive major gene for high IgE levels acting independently of specific response to allergens. *Genet Epidemiol* 12: 93-105, 1995

Doolittle TH, Myers RH, Lechrich JR, Birnbaum G, Sheremata W, Franklin GM, Nelson LM, Hauser SL.: Multiple sclerosis sibling pairs: clustered onset and familial predisposition. *Neurology* 40: 1545- 1552, 1990

Doull IJ, Lawrence S, Watson M, Begishvili T, Beasley RW, Lampe F, Holgate T, Morton NE: Allelic Association of gene markers on chromosomes 5q and 11q with atopy and bronchial responsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 1280- 1284, 1996

Duquette P, Pleines J, Girard M, Charest L, Senecal-Quevillon M, Masse C: The increased susceptibility in woman to multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 19: 466-471, 1992

Duschl A, Sebald W: Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond. *Eur Cytokine Netw* 7: 37-49, 1996

Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, Murray TJ, Seland TP, Duquette P, Grey T et al.: A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 315: 1638-1642, 1986

Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ: A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377: 150-151, 1995

Ebers GC, Kukay K, Bulman DE et al.: A full genome search in multiple sclerosis. *Nature Genet* 13: 472-476, 1996

Epplen C, Jackel S, Santos EJ, D'Souza M, Poehlau D, Dotzauer B, Sindern E, Haupts M, Rude KP, Weber F, Stover J, Poser S, Gehler W, Malin JP, Przuntek H, Epplen JT: Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol* 41: 341-52, 1997

Eriksson NE: Allergy screening with Phadiatop and CAP Phadiatop in combination with a questionnaire in adults with asthma and rhinitis. *Allergy* 45: 285, 1990

Excoffier L, Slatkin M: Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 12: 921, 1995

Fernandez- Botran R, Vitetta ES: Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins. *J Exp Med* 174: 673- 681, 1991

Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P: Blockstruktur des menschlichen Genoms, *Deutsches Ärzteblatt*, 47: 3190- 3195, 2002

Fujiwara H, Hanissian SH, Tsytsykova A, Geha RS: Homodimerization of the human interleukin 4 receptor α chain induces C ϵ germline transcripts in B cells in the absence of the interleukin 2 receptor α chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5866-5871, 1997

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D: The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225-2229, 2002

Gajewski TF, Fitch FW: Antiproliferative effect of IFN- γ in immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140: 4245-4252, 1989

Galizzi JP, Zuber CE, Harada N, Gorman DM, Djossou O, Kastelein R, Banchereau J, Howard J, Miyajima A: Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin 4 receptor. *Int Immunol* 2: 669, 1990

Gauchat JF, Schlagenhauf E, Feng NP, Moser R, Yamage M, Jeannin P, Alouani S, Elson G, Notarangelo LD, Wells T, Eugster HP, Bonnefoy JY: A novel 4-kb interleukin-13 receptor α mRNA expressed in human B, T and endothelial cells encoding an alternate type-II interleukin-4/ interleukin-13 receptor. *Eur J Immunol* 27: 971-978, 1997

Gautaman SC, Chikkala NF: Anti-inflammatory action of IL-4. Negative regulation of contact sensitivity to trinitrochlorobenzene. *J Immunol* 148: 1411-1415, 1992

Genain CP, Nguyen MH, Letvin NL, Pearl R, Davis RL, Adelman M, Lees MB, Linington C, Hauser SL : Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* 96: 2966-2974, 1995

Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS : Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5: 170-175, 1999

Gerrard JW, Rao DC, Morton NE: A genetic study of immunoglobulin E. *Am J Hum Genet* 30: 46-58, 1978

Gessner A, Schroppel K, Will A, Enssle KH, Lauffer L, Röllinghoff M: Recombinant soluble interleukin-4 (IL-4) receptor act as an antagonist of IL-4 in murine cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immun* 62: 4112, 1994

Gessner A, Röllinghoff M: Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology* 201: 308-316, 1999

Gessner A, Röllinghoff M: Biologic functions and signaling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunobiology* 201: 285-307, 2000

Goddart KA, Hopkins PJ, Hall JM, Witte JS: Linkage disequilibrium and allele- frequency distributions for 114 single- nucleotide polymorphisms in five populations. *Am J Hum Genet* 66: 216- 234, 2000

Gosset P, Lamblin-Degros C, Tillie-Leblond I, Charbonnier AS, Joseph M, Wallaert B, Kochan JP, Tonnel AB: Modulation of high-affinity IgE receptor expression in blood monocytes: opposite effect of IL-4 and glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 107:114-22, 2001

Gran B, Hemmer B, Vergelli M, McFarland HF, Martin R: Molecular mimicry and multiple sclerosis: Degenerate T-cell recognition and the induction of autoimmunity. *Ann Neurol* 45: 559-567, 1999

Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg JC, Baldini, Frizsch C, Weiland SK, Erickson RP, von Mutius E, Martinez FD: A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol* 105: 506- 513, 2000.

Grimbacher BS, Holland SM, Puck JM: The interleukin-4 receptor variant Q551R in hyper-IgE syndrome. *N Engl J Med* 338: 1073, 1998

Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayva R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, onaldson DD, Locksley RM, Cony DB: Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 282:2261- 2262, 1998

Guo SW, Thompson EA: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361, 1992

Haagerup A, Bjerke T, Schiotz PO, Dahl R, Binderup HG, Kruse TA: No linkage and association of atopy to chromosome 16 including the interleukin-4 receptor gene. *Allergy* 56: 775-779, 2001

Haagerup A, Bjerke T, Schiotz PO, Binderup HG, Dahl R, Kruse TA: Asthma and atopy- a total genome scan for susceptibility genes. *Allergy* 57: 680-686, 2002

Hackstein H, Kluter H, Fricke L, Hoyer J, Bein G: The IL-4 receptor alpha-chain variant Q576R is strongly associated with decreased kidney allograft survival. *Tissue Antigens* 54: 471-477, 1999

Hackstein H, Hecker M, Kruse S, Bohnert A, Ober C, Deichmann KA, Bein G: A novel polymorphism in the 5'promoter region of the human interleukin-4 receptor α -chain gene is associated with decreased soluble interleukin-4 receptor protein levels. *Immunogenetics* 53: 264-269, 2001

Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, Gusella JF, Kim DJ, Terwedow H, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Haynes CS, Roses AD, Lee A, Shaner B, Menold M, Seboun E, Fitoussi RP, Gartoux C, Reyes C, Ribierre F, Gyapay G, Weissenbach J, Hauser SL, Goodkin DE, Lincoln R, Usuku K, Oksenberg JR, et al.: A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. *Nat Genet* 13, 469- 471, 1996

Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Oksenberg JR, Lincoln R, Zhang DY, Banatao DR, Gatto N, Goodkin DE, Hauser SL. Related Articles, Links Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet* 7: 1229-1234, 1998

Hakonarson H, Bjornsdottir US, Halapi E, Palsson S, Adalsteinsdottir E, Gislason D, Finnbogason G, Gislason T, Kristjansson K, Arnason T, Birkisson I, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K: A major susceptibility gene for asthma maps to chromosome 14q24. *Am J Hum Genet* 71: 483-491, 2002

Haque SJ, Harbor P, Tabrizi M, Yi T, Williams BR: Protein-tyrosine phosphatase Shp-1 is a negative regulator of IL-4 – and IL-13-dependent signal transduction. *J Biol Chem* 273: 33893, 1998

Harada N, Yang G, Miyajima A, Howard M: Identification of an essential region for growth signal transduction in the cytoplasmic domain of the human interleukin-4 receptor. *J Biol Chem* 267: 22752-22758, 1992

Harada N, Higuchi K, Wakao H, Hamasaki N, Izuhara K: Identification of the critical portions of the human IL-4 receptor α chain for activation of STAT6. *Biochem Biophys Res Commun* 246 : 675-680, 1998

Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Picolli DS, Hamilton JA: Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor α interleucine 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3803-3807, 1988

He B, Xu C, Yang B, Landtblom AM, Fredrikson S, Hillert J: Linkage and association analysis of genes encoding cytokines and myelin proteins in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 86: 13-9, 1998

Heinzmann A, Mao XO, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, Umeshita R, Abe Y, Braun S: Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet* 9: 549- 559, 2000

Heldin CH: Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80: 213-223, 1995

Hershey GK, Friedrich MF, Esswein LA, Thomas ML, Chatila TA: The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. *N Engl J Med* 337:1720-1725, 1997

Hilton DJ, Zhang JG, Metcalf D, Alexander WS, Nicola NA, Willson TA: Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 497-501, 1996

Hogencamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG: The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 72: 871-878, 1997

Hohlfeld R, Meinl E, Weber F, Zipp F, Schmidt S, Sotgiu S, Goebels N, Voltz R, Spuler S, Iglesias A, et al.: The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology* 45: 33-38, 1995

Hohlfeld R: Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives. *Brain* 120: 865-916, 1997

Hou J, Schindler J, Henzel WJ, Ho TC, Brasseur M, McKnight SL: An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science*. 265:1701-1706, 1994

Howard M, Farrar J, Hilfiker M, Johnson B, Takatsu K, Hamaoka T, Paul WE: Identification of a T cell-derived b cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 155: 914-923, 1982

Howard TD, Koppelman GH, Xu J, Zheng S, Postma DS, Meyers DA, Blecher E: Gene-Gene Interaction in Asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch Population with Asthma. *Am J Hum Genet* 70, 230- 236, 2002

Idzerda RL, March CJ, Mosley B, Lyman SD, Vanden-Bos T, Gimpel SD, Din WS, Grabstein KH, Widmer MB, Park LS, Cosman D, Beckmann P: Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med* 171: 861-873, 1990

Ihle JN, Kerr IM: Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11:69-74, 1995

Ihle JN: Cytokine receptor signaling. *Nature* 377: 591-594, 1995

Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O: Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13: 369-398, 1995

Imani FB, Ragerx B, Catipovic B, Marsh DG: Interleukin-4 (IL-4) induces phosphatidylinositol 3-kinase (p85) dephosphorylation. Implications for the role of SHP-1 in the IL-4-induced signals in human B cells. *J Biol Chem* 272: 7927, 1997

Izuhara K, Heike T, Otsuka T, Yamaoka K, Mayumi M, Imamura T, Niho Y, Harada N: Signal transduction pathway of interleukin-4 and interleukin-13 in human B cells derived from X-linked severe combined immunodeficiency patients. *J Biol Chem* 271: 619-622, 1996

Izuhara K, Shirakawa T: Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. *Int J Mol Med* 3: 3-10, 1999

Jacobs KB, Burton PR, Iyengar SK, Elston RC, Palmer LJ : Pooling data and linkage analysis in the chromosome 5q candidate region for asthma. *Genet Epidemiol* 21: 103-108, 2001

Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, Ueda H, Cordell HJ, Eaves IA, Dudbridge F, Twells RC, Payne F, Hughes W, Nutland S, Stevens H, Carr P,

Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Gough SC, Clayton DG, Todd JA: Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 29: 233-237, 2001

Jung T, Schrader N, Hellwig M, Enssle KH, Neumann C: Soluble human interleukin-4 receptor is produced by activated T cells under the control of metalloproteinases. *Int Arch Allergy Immunol* 119: 23-30, 1999

Kanemitsu S, Takabayashi A, Sasaki Y, Kuromaru R, Ihara K, Kaku Y, Sakai K, Hara T : Association of interleukin-4 receptor and interleukin-4 promoter gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42: 1298-1300, 1999

Keegan AD, Nelms K, White M, Wang L-M, Pierce JH, Paul WE: An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell* 76: 811-820, 1994

Kerlero de Rosbo N, Hoffman M, Mendel I, Yust I, Kaye J, Bakimer R, Flechter S, Abramsky O, Milo R, Karni A, Ben-Nun A: Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol*. 27: 3059-3069, 1997

Kimura M, Tsuruta S, Yoshida T: IL-4 production by PBMCs on stimulation with mite allergen is correlated with the level of serum IgE antibody against mite in children with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105:327-32, 2000

Kinnunen E, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K: Multiple sclerosis in a nation-wide series of twins. *Neurology* 37: 1627-1629, 1987

Kondo MT, Takeshita N, Ishii M, Nakamura S, Watanabe KI, Arai K, Sugamura: Sharing of the Interleukin-2 (IL-2) receptor γ chain between receptors for IL-2 and IL-4. *Science* 262: 1874-1877, 1993

Kopf M, LeGros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G: Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245- 248, 1993

Koppelman GH: Genetics of asthma and atopy. Dissertationsschrift, 2001.

Koppelman GH, Stine OC, Xu J, Howard TD, Zheng SL, Kauffman HF, Bleecker ER, Meyers DA, Postma DS: Genome-wide search for atopy susceptibility genes in Dutch families with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109: 498-506, 2002

Kotanides H, Reich NC: Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor gene. *J Biol Chem* 271:25555-25561, 1996

Kruse S, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA: Characterization of the membrane-bound and a soluble form of human IL-4 receptor alpha produced by alternative splicing. *Int Immunol* 11: 1965-1970, 1999a

Kruse S, Japha T, Tedner M, Sparholt SH, Forster J, Kuehr J, Deichmann KA: The polymorphisms S503P and Q576R in the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with atopy and influence the signal transduction. *Immunology* 96:365-371, 1999b

Kuokkanen S, Gschwend M, Rioux JD, Daly MJ, Terwilliger JD, Tienari PJ, Wikström J, Palo J, Stein LD, Hudson TJ, Lander ES, Peltonen L: Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families. *Am J Hum Genet* 61 : 1379-1387, 1997

Kurtzke JF, Hyllested K: Multiple sclerosis in the Faroe Islands: I. Clinical and epidemiological features. *Ann Neurol* 5: 6-21, 1979

Kurtzke JF, Gudmundsson KR, Bergmann S: Multiple sclerosis in Iceland. Evidence of a post war epidemic. *Neurology* 32: 143-150, 1982

Kurtzke JF: Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444-1452, 1983

Kurtzke JF: Epidemiology of multiple sclerosis. In: Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL (eds.). *Handbook of Clinical Neurology*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher BV: 259-287, 1985

Kutter S: Jeder vierte leidet heute an Allergien. Und jeder zweite Allergiker bekommt Asthma. Neue Therapien versprechen Linderung. *Wirtschaftswoche* 13: 85-87, 1999

Lafaille JJ, Keere FV, Hsu AL, Baron JL, Haas W, Raine CS, Tonegawa S: Myelin basic protein-specific T helper 2 (Th2) cells cause experimental autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient hosts rather than protect them from the disease. *J Exp Med* 186: 307-312, 1997

Lai SY, Molden J, Liu KD, Puck JM, White MD, Goldsmith MA: Interleukin-4-specific signal transduction events driven by homotypic interactions of the interleukin-4 receptor α subunit. *EMBO J* 15: 4506-4514, 1996

Laitinen T, Daly MJ, Rioux JD, Kauppi P, Laprise C, Petays T, Green T, Cargill M, Haahtela T, Lander ES, Laitinen LA, Hudson TJ, Kere J: A susceptibility locus for asthma-related traits on chromosome 7 revealed by genome-wide scan in a founder population. *Nat Genet* 28: 87-91, 2001

Langdon DW, Thompson AJ: Cognitive problems in multiple sclerosis. *MS Management* 3: 1 & 7-9, 1996

Lin J-X, Migone T-S, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L, Yamauchi A, Bloom ET, Mietz J, John S, Leonard WJ: The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13 und IL-15. *Immunity* 2: 331-339, 1995

Lowenthal JW, Castle BE, Christiansen J, Schreurs J, Rennick D, Arai N, Hoy P, Takebe Y, Howard M: Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells. *J Immunol* 140: 456, 1988

Lublin FD, Reingold SC: Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46: 907-11, 1996

Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H: Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 6: 259-274, 1996

Losman JA, Chen XP, Hilton D, Rothman P: Cutting edge: SOCS-1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction *J Immunol* 162: 3770, 1999

Maggi E, Macchia D, Parronchi P, Del Prete G, De Carli M, Piccinni MP, Simonelli C, Biswas P, Romagnani S, Ricci M: The IgE response in atopy and infections. *Clin Exp Allergy Suppl* 1:72-78, 1991

Malerba G, Trabetti E, Patuzzo C, Lauciello MC, Galavotti R, Pescollderung L, Boner AL, Pignatti PF: Candidate genes and a genome-wide search in Italian families with atopic asthmatic children. *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 4:27-30, 1999

Malerba G, Lauciello MC, Scherpbier T, Trabetti E, galavotti R, Cusin V, Pescollderung L, Zanoni G, Martinati LC, Boner AL, Levitt RC, Pignatti PF: Linkage analysis of chromosome 12 markers in Italian families with atopic asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1587-1590, 2000

Mandler R, Finkelman FD, Levine AD, Snapper CM: IL-4 induction of IgE class switching by lipopolysaccharide-activated murine B cells occurs predominantly through sequential switching. *J Immunol* 150: 407-418, 1993

Marrosu MG, Murru MR, Costa G, Murru R, Muntoni F, Cucca F : DRB1-DQA1-DQB1 loci and multiple sclerosis predisposition in the Sardinian population. *Hum Molec Genet* 7: 1235-1237, 1998

Marsh DG, Meyers DA, Bias WB: The epidemiology and genetics of atopic allergy. *New Engl J Med* 305: 1551-1559, 1981

Marsh DG, Neely JD, Breazeale DR, Ghosh B, Freidhoff LR, Ehrlich-Kautzky E, Schou C, Krishnaswamy G, Beaty TH: Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. *Science* 264 (5162): 1152-1156, 1994

Martin R, McFarland HF, McFarlin DE: Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 10: 153-187, 1992

McDonnell GV, Kirk CW, Hawkins SA, Graham CA: An evaluation of interleukin genes fails to identify clear susceptibility loci for multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 176: 4-12, 2000

McDonnell GV, Hawkins SA : Application of the Poser criteria in primary progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 42: 982-3, 1997

McFarland HF: Twin studies and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 32: 722-723, 1993

Meyers DA, Postma DS, Panhuysen CI, Xu J, Amelung PJ, Levitt RC, Bleecker ER: Evidence for a locus regulating total serum IgE levels mapping to chromosome 5. *Genomics* 23, 464- 470, 1994

Miossec P: Acting on the cytokine balance to control autoimmunity and chronic inflammation. *Eur Cytokine Netw* 4: 245-251, 1993

- Mitsuyasu H, Izuhara K, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Enomoto T, Kawai M, Sasaki S, Dake Y, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM: Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. *Nat Genet* 19: 119, 1998
- Mitsuyasu H, Yanagihara Y, Mao XQ, Gao PS, Arinobu Y, Ihara K, Takabayashi A, Hara T, Enomoto T, Sasaki S, Kawai M, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM, Izuhara K: Cutting edge: dominant effect of Ile50Val variant of the human IL-4 receptor alpha-chain in IgE synthesis. *J Immunol* 162: 1227, 1999
- Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai K: Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol* 10: 295-331, 1992
- Moffatt MF, Hill MR, Cornelis F, Schou F, Faux JA, Young RP, James AL, Ryan G, le Souef P, Musk AW, et al.: Genetik linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses. *Lancet* 343 (8913): 1597-1600, 1994
- Moffatt MF, Cookson WOMC: Linkage and Candidate Gene Studies in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 110-112, 1997
- Moffatt MF, Cookson WOCM: Maternal effects in atopic disease. *Clin Exp Allergy* (Suppl. 1), 56-61, 1998
- Morel PA, Oriss TB: Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit Rev Immunol* 18: 275-303, 1998
- Moriggl R, Erhardt I, Kammer W, Berchthold S: Activation of STAT6 is not dependent on phosphotyrosine-mediated docking to the interleukin-4 receptor and can be blocked by dominant-negative mutants of both receptor subunits. *Eur J Biochem* 251: 25-35, 1998
- Moser R, Fehr J, Bruijnzeel PLB: IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. *J Immunol* 149: 1432-1438, 1992
- Mosley B, Beckmann MP, March CJ, Idzerda RL, Gimpel SD, VandenBos T, Friend D, Alpert A, Anderson D, Jackson J, Wignall JM, Smith C, Gallis B, Sims JE, Urdal D, Widmer MB, Cosman D, Park LS: The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms: *Cell* 59: 335-348, 1989.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136: 2348-2357, 1986.
- Mosmann TR, Coffman RL: Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145, 1989
- Mujica-Lopez KI, Flore- Martinez SE, Ramos- Zepeda R, Castaneda- Ramos SA, gazca-Aguilar A, garcia- Rerez J, Sanchez- Corona J: Association analysis of polymorphisms in the interleukin-4 receptor (alpha) gene with atopic asthma in patients from western Mexico. *Eur J Immunogenet* 29: 375- 378, 2002
- Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood HF, Thorpe J, Miller D, Compston DAS: The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 44: 11-15, 1994

Murata T, Taguchi J, Puri RK: Interleukin-13 receptor α' but not α chain: a functional component of interleukin-4 receptors. *Blood* 91: 3884-3891, 1998a

Murata T, Obiri NI, Puri RK: Structure of and signal transduction through interleukin-4 and interleukin-13 receptors. *Int J Mol Med* 1: 551, 1998b

Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA: Polarization of IL-4- and IFN- γ -producing CD4⁺ T cells following activation of naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 158: 1085-1094, 1997a

Nakamura T, Lee RK, Nam SY, Podack ER, Bottomly K, Flavell RA: Roles of IL-4 and IFN- γ in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J Immunol* 158: 2648-2653, 1997b

Neddenriep D, Schumacher MJ, Lemen RJ: Asthma in childhood. *Curr Probl Pediatr* 19: 325-385, 1989

Nelms K, Snow AL, Hu-Li J, Paul WE: FRIP, a hematopoietic cell-specific rasGAP-interacting protein phosphorylated in response to cytokine stimulation. *Immunity* 9: 13, 1998

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE: The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17: 701, 1999

Neukirch F, Lyon-Caen O, Clanet M, Bousquet J, Feingold J, Druet P.: Asthma, nasal allergies, and multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* 99:270- 271, 1997

Nicholson SE, Hilton DJ: The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *J Leukoc Biol* 63: 665, 1998

Nickerson DA, Scott LT, Weiss KM, Clark AG, Hutchinson RG, Stengard J, Salomaa V, Vartiainen E, Boerwinkle e, Sing CF: DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet* 19: 233- 240, 1998

Noelle R, Krammer PH, Ohara J, Uhr JW, Vitetta ES: Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 6149-6153, 1984

Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K, Imoto N, Nakahara S, Matsui A, Hamaguchi H: Lack of association of atopy/asthma and the interleukin-4 receptor alpha gene in Japanese. *Clin Exp Allergy* 29: 228-233, 1999a

Noguchi E, Shibasaki M, Arinami T, Takeda K, Yokouchi Y, Kobayashi K, Imoto N, Nakahara S, Matsui A, Hamaguchi H: No association between atopy/ asthma and the ILe50Val polymorphism of IL-4 receptor. *Am J Respir Crit Care Med* 160:342-345, 1999b

Ober C, Cox NJ, Abney M, Di Rienzo A, Lander ES, Changyaleket B, Gidley H, Kurtz B, Lee J, Nance M, Petterson A, Prescott J, Richardson A, Schlenker E, Summerhill E, Willadsen S, Parry R: Genome-wide search for asthma susceptibility loci in a founder population. *Hum Mol Genet* 7: 1393-1398, 1998

Ober C, Tsalenko A, Willadsen S, Newman D, Daniel R, Wu X, Anal J, Hoki D, Schneider D, True K, Schou C, Parry R, Cox N: Genome-wide screen for atopy susceptibility alleles in the Hutterites. *Clin Exp Allergy* 29: 11-15, 1999

Ober C, Leavitt SA, Tsalenko A, Howard TD, Hoki DM, Daniel R, Newman DL, Wu X, Parry R, Lester LA, Solway J, Blumenthal M, King RA, Xu J, Meyers DA, Bleecker ER, Cox NJ: Variation in the interleukin 4-receptor alpha gene confers susceptibility to asthma and atopy in ethnically diverse populations. *Am J Hum Genet* 66: 517-26, 2000a

Ober C, Tsalenko A, Parry R, Cox NJ: A second-generation genomewide screen for asthma-susceptibility alleles in a founder population *Am J Hum Genet* 67: 1154- 1162, 2000b

Ohara J, Paul WE: Up-regulation of interleukin 4/B-cell stimulatory factor 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci* 85: 8221, 1988

Oiso N, Fukai K, Ishii M: Interleukin 4 receptor alpha chain polymorphism Gln551Arg is associated with adult atopic dermatitis in Japan. *Br J Dermatol* 142: 1003-1006, 2000

Olerup O, Hillert J, Fredrikson S, Olsson T, Kam-Hansen S, Moller E, Carlsson B, Wallin J: Primarily chronic progressive and relapsing/remitting multiple sclerosis: two immunogenetically distinct disease entities. *Proc Natl Acad Sci* 86:7113-7117, 1989

Olerup O, Hillert J: HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38: 1-15, 1991

Olsson T: Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* 45: 11-15, 1995

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> (IL4RA [MIM 147781])

Orchansky PL, Ayres SD, Hilton DJ, Schrader JW: An interleukin- (IL)-13 receptor lacking the cytoplasmic domain fails to transduce IL-13-induced signals and inhibits response to IL-4. *J Biol Chem* 272: 22940-22947, 1997

Oro AS, Guarino TJ, Driver R, Steinman L, Umetsu DT: Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. *J Allergy Clin Immunol* 97:1402- 1408, 1996

Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K et al.: Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408: 57-63, 2000

Parry RG, Gillespie KM, Parnham A, Clark AGB, Mathieson PW: Interleukin-4 and interleukin-4 receptor polymorphisms in minimal change nephropathy. *Clinical Science* 96: 665-668, 1999

Patuzzo C, Trabetti E, Malerba G, Martinati LC, Boner AL, Pescolliderungg L, Zanoni G, Pignatti PF: No linkage or association of the IL-4Ralpha gene Q576R mutation with atopic asthma in Italian families. *J Med Genet* 37: 382-384, 2000

Paul WE: Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77: 1859-1870, 1991

Paul WE, Seder RA: Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251, 1994

Paz K, Hemi R, Leroith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y: A molecular basis for insulin resistance. *J Biol Chem* 272: 29911-8, 1997

Piddlesden SJ, Lassmann H, Zimprich F, Morgan BP, Linington C: The demyelinating potential of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein is related to their ability to fix complement. *Am J Pathol* 143: 555-564, 1993

Plaut M, Piez MH, Watson CJ, Hanley-Hide J, Nordan RP, Paul WE: Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* 339: 64-67, 1989

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW: New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13: 227-31, 1983

Postma DS, Bleeker ER, Amelung PJ, Holroyd KJ, Xu J, Panhuysen CI, Meyers DA, Levitt RC: Genetic susceptibility to asthma-bronchial hyperresponsiveness co-inherited with a major gene for atopy. *New Engl J Med* 333, 894- 900, 1995

Pritchard MA, Baker E, Whitmore SA, Sutherland GR, Idzerda RL, Park LS, Cosman D, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, et al: The interleukin-4 receptor gene (IL4R) maps to 16p11.2-16p12.1 in human and to the distal region of mouse chromosome 7. *Genomics* 10: 801-806, 1991

Puccetti P, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Mosci P, Enssle KH, Romani L, Bistoni F: Cure of murine candidiasis by recombinant soluble interleukin-4 receptor. *J Infect Dis* 169: 1325, 1994

Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie ANJ, Menon S, Zurawski G, DeWaal Malefyt R, DeVries JE: Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3730-3734, 1993

Quelle FW, Shimoda K, Thierfelder W, Fischer C, Kim A, Ruben SM, Cleveland JL, Pierce JH, Keegan AD, Nelms K, Paul WE, Ihle JN: Cloning of murine Stat6 and human Stat6. Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in response to IL-4 and IL-13 but are not required for mitogenesis. *Mol Cell Biol* 15: 3336-3343, 1995

Racke MK, Bonomo A, Scott DE, Cannella B, Levine A, Raine CS, Shevach EM, Rocken M: Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J Exp Med* 180: 1961-1966, 1994

Raine CS, Cannella B, Hauser SL, Genain CP: Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a case for antigen-specific antibody mediation. *Ann Neurol* 46: 144-160, 1999

Reichel M, Nelson BH, Greenberg PD, Rothman PB: The IL-4 receptor α chain cytoplasmatic domain is sufficient for activation of JAK-1 and STAT6 and the induction IL-4-specific gene expression. *J Immunol* 158: 5860-5867, 1997

Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A, Luer W, Helwig A, Poser S: Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 37: 82-88, 1995

Risma KA, Wang N, Andrews RP, Cunningham CM, Ericksen MB, Bernstein JA, Chakraborty R, Hershey GK: V75R576 IL-4 receptor alpha is associated with allergic asthma and enhanced IL-4 receptor function. *J Immunol* 169: 1604-1610, 2002

Robertson CF, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DAS: Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 119: 449-455, 1996a

Robertson CF, Clayton D, Fraser M, Deans J, Compston DAS: Clinical concordance in sibling pairs with multiple sclerosis. *Neurology* 47: 347-352, 1996b

Robertson NP, O'Riordan JI, Chataway J, Kingsley DPE, Miller DH, Clayton D, Compston DA: Offspring recurrence rates and clinical characteristics of conjugal multiple sclerosis. *Lancet* 349: 1587-1590, 1997

Röcken M, Racke M, Shevach EM: IL-4 induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. *Immunol Today* 17: 225-231, 1996

Rogala B, Rymarczyk B, Moczulski D, Grzeszczak W: The role of R576Q polymorphism of interleukin-4 receptor alpha gene in atopy: results of a family-based study design. *J Invest Allergol Clin Immunol* 11: 285-289, 2001

Romagnani S: Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* 11:316-321,1990

Romagnani S: Human Th1 and Th2 subsets: doubt no more. *Immunol Today* 12: 256-257, 1991.

Romagnani S: Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol* 6: 838-846, 1994

Romani L, Mencacci A, Grohmann U, Mocci U, Mosci S, Puccetti P, Bistoni F: Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J Exp Med* 176: 19, 1992

Rosa-Rosa L, Zimmermann N, Bernstein JA, Rothenberg ME, Hershey GK: The R576 IL-4 receptor α allele correlates with asthma severity. *J Allergy Clin Immunol* 104: 1008-1014, 1999

Rudick RA, Cohen JA, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP, Ransohoff RM: Management of Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 34: 1604-1611, 1997

Russel SM, Keegan AD, Harada N, Nakamura Y, Noguchi M, Leland P, Friedman MC, Miyajima Am Puri RK, Paul Wem Leonard WJ: IL-2 receptor γ chain: a functional component of the interleukin-4 receptor. *Science* 262: 1880-1883, 1993

Ryan JJ, McReynolds LJ, Keegan A, Wang L-H, Garfein E, Rothman P, Nelms K, Paul WE: Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity* 4: 123-132, 1996

Ryan JJ, McReynolds LJ, Huan H, Nelms K, Paul WE : Characterization of a mobile Stat6 activation motif in the human IL-4 receptor. *J Immunol* 161: 1811, 1998

Rychlik, Rhoads: Computerprogramm Oligo, 1989

Sad S, Mosmann TR: Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secreting phenotype. *J Immunol* 153: 3514-3522, 1994

Sadick MD, Heinzel FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM: Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-dependent mechanism. *J Exp Med* 171:115, 1990

Sadovnick AD, Baird PA, Ward RA: Multiple sclerosis: Updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29: 533-541, 1988

Sadovnick AD, Bulman D, Ebers GC: Parent-child concordance in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 29: 252-255, 1991

Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GPA, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ et al.: A population based study of multiple sclerosis in twins: updated. *Ann Neurol* 33: 281-285, 1993

Sadovnick AD, Ebers GC: Epidemiology of multiple sclerosis: A critical overview. *Can J Neurol Sci* 20: 17-29, 1993

Sadovnick AD, Ebers GC, Dyment DA, Risch NJ: Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group. *Lancet* 374: 1728-1731, 1996

Sandford A, Weir T, Pare P: The genetics of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1749-1765, 1996

Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, Robertson N, Clayton D, Goodfellow PN, Compston A: A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nature Genet* 13: 464-468, 1996

Schauer U, Schmitt M, Muller S, Enssle K, Kurrle R, Sundermann U, Bender A, Wahn U, Rieger CH: Soluble interleukin-4 receptor in atopic children. *Int Arch, Allergy Immunol* 108: 175- 182, 1995

Schindler C, Darnell JE Jr: Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64: 621-651, 1995

- Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, Newman W, Lusinskas FW, Gimbrone MA, McInyre BW, Bochner BS: IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. *J Immunol* 148: 1086-1092, 1992
- Schneider S, Kueffer JM, Roessli D, Excoffier L. Arlequin: Ver. 1.1.: A Software for Population Genetic Data Analysis. Switzerland, Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1997
- Schulte T, KurrleR, Rollinghoff M, Gessner A: Molecular characterization and functional analysis of murine interleukin 4 receptor allotypes. *J Exp Med* 186: 1419, 1997
- Schultz C, Izuhara K, Coffman R, Harada N: The critical region in the cytoplasmatic domain of human IL-4 receptor for induction of IgE synthesis. *Immunol Lett* 46: 215-219, 1995
- Scott P: IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity. *Science* 260: 496-497, 1993
- Secrist H, Chelen CJ, Wen Y, Marshall JD, Umetsu DT: Allergen immunotherapy decreases interleukin-4 production in CD4⁺ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 178: 2123, 1993
- Seder RA, Paul WE : Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol* 12: 635-673, 1994
- Seldin DC, Leder P: Mutational analysis of a critical signaling domain of the human IL-4 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2140-2144, 1994
- Shamshiev A, Donda A, Carena I, Mori L, Kappos L, De Libero G: Self glycolipids as T cell autoantigens. *Eur J Immunol* 29: 1667-1675, 1999
- Shaw MK, Lorens JB, Dhawan A, DalCanto R, Tse HY, Tran AB, Bonpane C, Eswaran SL, Brocke S, Sarvetnick N, Steinman L, Nolan GP, Fathman CG: Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 185: 1711-4, 1997
- Sheremata WA, Poskanzer DC, Withum DG, MacLeod CL, Whiteside ME : Unusual occurrence on a tropical island of multiple sclerosis. *Lancet* II: 618, 1985
- Shirakawa T, Hashimoto T, Furuyama J, Takeshita T, Morimoto K: Linkage between severe atopy and chromosome 11q13 in Japanese families. *Clin Genet* 46: 228-232, 1994
- Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin J: The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275: 77-79, 1997
- Shirakawa I, Deichmann KA, Izuhara I, Mao I, Adra CN, Hopkin JM: Atopy and asthma: genetic variants of IL-4 and IL-13 signalling. *Immunol Today* 21: 60-64, 2000
- Sibley WA, Bamford CR, Clark K: Clinikal viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1: 1313-1315, 1985

- Slatkin M, excoffier L: Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity* 76: 377, 1996
- Snapper CM, Paul WE: Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236(4804): 944-947, 1987
- Storch M, Lassmann H: Pathology and pathogenesis of demyelinating diseases. *Curr Opin Neurol* 10(3):186-192, 1997
- Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H: Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43: 465-471, 1998a
- Storch MK, Stefferl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M, Olsson T, Linington C, Lassmann H: Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol* 8: 681-694, 1998b
- Strachan DP: Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J* 299: 1259- 1260, 1989
- Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, Nakamura M, Takeshita T: The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. *Adv Immunol* 59 : 225, 1995
- Sun XJ, Wang L-M, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen E, Lane WS, Pierce JH, White MF: Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377 : 173-177, 1995
- Takabayashi A, Ihara K, Sasaki Y, Suzuki Y, Nishimura S, Izuhara K, Hamasaki N, Hara T: Childhood atopic asthma: positive association with a polymorphism of IL-4 receptor alpha gene but not with that of IL-4 promoter or Fc epsilon receptor I beta gene. *Exp Clin Immunogenet* 17: 63-70, 2000
- Tan EC, Lee BW, Tay AW, Shek L, Chew FT, Tay AH: Interleukin-4 receptor variant Q576R: ethnic differences and association with atopy. *Clin Genet* 56: 333-334, 1999a
- Tan EC, Lee BW, Chew FT, Shek L, Tay AW, Tay AH: IL-4Ralpha gene Ile50Val polymorphism. *Allergy* 54: 1005-1007, 1999b
- The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) steering committee: Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 351: 1225-12332, 1998
- Thomas NS, Wilkinson J, Holgate ST: The Candidate Region Approach to the Genetics of Asthma and Allergy. *Am J Crit Care Med* 156: 144-151, 1997
- Thomas NS, Holgate ST: Genes for asthma on chromosome 11: an update. *Clin Exp Allergy* 28: 397-391, 1998
- Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi M, Montalban X, De Sa J: Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 120: 1085-1096, 1997
- Tienari PJ: Multiple sclerosis: Multiple etiologies, multiple genes? *Ann Med* 26: 259-269, 1994

Tiwari JL, Terasaki PI: Multiple sclerosis. In: Tiwari JL, Terasaki PI (eds.). HLA and Disease Associations. New York: Springer Verlag: 152-167, 1985

Van der Pouw Kraan TCTM, van Veen A, Boeije LCM: An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes and Immunity* 1:61- 65, 1999

Vannier E, Miller LC, Dinarello CA: Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: Interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4076-4080, 1992

Venanzi S, Malerba G, Galavotti R, Lauciello MC, Trabetti E, Zanoni G, Pescolliderung L, Martinati LC, Boner AL, Pignatti PF: Linkage to atopy on chromosome 19 in north-eastern Italian families with allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 31: 1220-1224, 2001

Von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai G, Roell T, Thiemann HH: Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 358-364, 1994

Waksman BH: Multiple sclerosis. *Curr Opin Immunol* 1: 733-739, 1989

Wallström E, Khademi M, Andersson M, Weissert R, Linington C, Olsson T: Increased reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides and epitope mapping in HLA DR2(15)+ multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 28: 3329-35, 1998

Wang LM, Myers MG, Sun XJ, Aaronson SA, White M, Pierce JH: IRS-1: Essential for Insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. *Science* 261 : 1591-1594, 1993

Wang HY, Paul WE, Keegan AD: IL-4 function can be transferred to the IL-2 receptor by tyrosine containing sequences found in the IL-4 receptor α chain. *Immunity* 4: 113-121, 1996

Wang Y, Shen B-J., W Sebald: A mixed charge pair in human interleukin-4 dominates high-affinity interaction with the receptor " chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1657-1662, 1997

Wang HY, Zamorano J, Yoerkie L, Paul WE, Keegan AD: The IL-4-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate is dependent on JAK1 expression in human fibrosarcoma cells. *J Immunol* 158: 1037, 1997

Wang HY, Shelburne CP, Zamorano J, Kelly AE, Ryan JJ, Keegan AD: Cutting edge: effects of an allergy-associated mutation in the human IL-4R α (Q551R) on human IL-4-induced signal transduction. *J Immunol* 162: 4385, 1999

Watanabe S, Kondo M, Takatsu K, Sugamura K, Arai K: Involvement of the interleukin-2 receptor gamma subunit in interleukin-4-dependent activation of mouse hematopoietic cells and splenic B cells. *Eur J Immunol* 25 : 126, 1995

Weinshenker BG, Santrach P, Bissonet AS, McDonnell SK, Schaid D, Moore SB, Rodriguez M: Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study. *Neurology* 51: 742-747, 1998

Wekerle H: Remembering MOG: autoantibody mediated demyelination in multiple sclerosis? Nat Med 5:153-154, 1999

Welham MJ, Learmonth L, Bone H, Schrader JW: Interleukin-13 signal transduction in lymphohemopoietic cells: similarities and differences in signal transduction with interleukin-4 and insulin. J Biol Chem 270: 12286-12296, 1995

Wierenga EA, Walchner M, Kick G, Kapsenberg ML, Weiss EH, Messer G: Evidence for suppressed activity of the transcription factor NFAT1 at its proximal binding element P0 in the IL-4 promoter associated with enhanced IL-4 gene transcription in T cells of atopic patients. Int Immunol 11:297-306, 1999

Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD: Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. Science 282: 2258- 2261, 1998

Wjst M: Genetik von Asthma im Kindesalter. Habilitationsschrift: 5, 1998

Wjst M, Fischer G, Immervoll T, Jung M, Saar K, Rueschendorf F, Reis A, Ulbrecht M, Gomolka M, Weiss EH, Jaeger L, Nickel R, Richter K, Kjellman NI, Griese M, von Berg A, Gappa M, Riedel F, Boehle M, van Koningsbruggen S, Schoberth P, Szczepanski R, Dorsch W, Silbermann M, Wichmann HE, et al.: A genome-wide search for linkage to asthma. German Asthma Genetics Group. Genomics 58: 1-8, 1999

Wjst M, Kruse S, Illig T, deichmann K: Asthma and IL-4 receptor alpha gene variants. Eur J immunogenet 29, 263- 268, 2002

Wolf G, Trub T, Ottinger E, Groninga L, Lynch A, White MF, Miyazaki M, Lee J, Shoelson SE: PTB domains of IRS-1 and Shc have distinct but overlapping binding specificities. J Biol Chem 270: 27407, 1995

Wu X, Di Rienzo A, Ober C: A population genetics study of single nucleotide polymorphisms in the interleukin 4 receptor α (IL4RA) gene. Genes and Immunity 2, 128- 134, 2001

Xu X, Fang Z, Wang B, Chen C, Guang W, Jin Y, Yang J, Lewitzky S, Aelony A, Parker A, Meyer J, Weiss ST, Xu X: a genomewide search for quantitative-trait loci underlying asthma. Am J Hum Genet 69: 1271-1277, 2002

Yin T, Tsang ML, Yang YC: JAK1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T lymphocytes. J Biol Chem 269:26614-26617, 1994

Youden WJ: Index rating for diagnostic test. Cancer 3: 32-35, 1950

Youn J, Hwang SE, Cho CS, Min JK, Kim WU, Park SH, Kim HY: Association of the interleukin-4 receptor α variant Q576R with Th1/Th2 imbalance in connective tissue disease. Immunogenetics 51: 743-746, 2000

Young RP, Dekker JW, Wordsworth BP, Schou C, Pile KD, Matthiesen F, Rosenberg WM, Bell JI, Hopkin JM, Cookson WO: HLA-DR and HLA-DP genotypes and immunoglobulin E responses to common major antigens. Clin Exp Allergy 24: 431-439, 1994

Zamorano J, Wang HY, Wang L-M, Pierce JH, Keegan AD: IL-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway. *J Immunol* 157: 4926-4934, 1996

Zamorano J, Keegan AD: Regulation of apoptosis by tyrosine-containing domains of IL-4R alpha: Y497 and Y713, but not the STAT6-docking tyrosines, signal protection from apoptosis. *J Immunol* 161: 859, 1998

Zamvil SS, Steinman L: The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* 8: 579-621, 1990

Zetterstrom O, Johansson SG: IgE concentrations measured by Phadebas IgE PRIST in serum of healthy adults and in patients with respiratory allergy. A diagnostic approach. *Allergy* 36: 537, 1981

Zhou MM, Huang B, Olejniczak ET, Meadows RP, Shuker SB, Miyazaki M, Trub T, Shoelson SE, Fesik SW: Structural basis for IL-4 receptor phosphopeptide recognition by the IRS-1 PTB domain. *Nat Struct Biol* 3: 388, 1996

Zurawski SM, Vega F Jr, Huyghe B, Zurawski G: Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO J* 12: 2663-2670, 1993

Zurawski SM, Chomarat P, Djossou O, Bidaud C, McKenzie ANJ, Miossec P, Banchereau J, Zurawski G: The primary binding subunit of the human interleukin-4 receptor is also a component of the interleukin-13 receptor. *J Biol Chem* 270: 13869-13878, 1995

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Aminosäure
AK	Antikörper
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Copy DNA</i>
cy-Kette	<i>Common gamma-Kette</i>
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Dinukleotidtriphosphate
EAE	Experimentelle allergische Encephalomyelitis
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRIP	<i>Interleukin-Four-Receptor Interacting Protein</i>
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
g	Gravitationsbeschleunigung
GM-CSF	<i>Granulocyte/Monocyte-colony stimulating factor</i>
Grb-2	<i>Growth factor receptor-bound-protein 2</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL-4	Interleukin-4
IL-4R α	Interleukin-4-Rezeptor alpha Kette
IL4R	Interleukin-4-Rezeptor alpha Ketten-Gen
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
I4R-Region	Insulin-Rezeptor/IL-4R- Region
JAK	Januskinase
K	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
μ	Mikro ($=10^{-9}$)
mol	Molekulare Einheit der Stoffmenge
MAG	<i>Myelin associated glycoprotein</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MS	Multiple Sklerose

MOBP	<i>Myelin oligodendrocyte basic protein</i>
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OD	<i>Optical Density</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Pondus hydrogenii</i>
PLP	<i>Myelin proteolipid protein</i>
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PPMS	<i>Primary progressive Multiple Sklerose</i>
PR	Progressionsrate
PTB-Domäne	Phosphotyrosinbindungs-Domäne
RRMA	<i>Relapsing remitting Multiple Sklerose</i>
SSP-PCR	<i>Sequence specific priming- Polymerase Chain Reaction</i>
SHIP	<i>SH2-containing inositol-5-phosphatase</i>
SHP-1	SH-Phosphatase-1
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
SPMS	<i>Secondary progressive Multiple Sklerose</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
sIL4R	<i>Soluble Interleukin-4 Rezeptor</i>
T	Thymin
T _a	<i>Annealing-Temperatur</i>
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
Th-Zelle	T-Helferzelle
T _m	Temperatur, bei der die Hälfte der DNA in Einzelstrangform vorliegt
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trometamol, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
T _s	Schmelztemperatur
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
4PS	<i>IL-4 induced phosphotyrosin substrates</i>
W	Tryptophan
Y	Tyrosinreste
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1	Pleiotrope Wirkung von IL-4 (nach Chomarat P, Banchereau J, 1997)	1
Abb. 2	Th1/Th2-Differenzierung (nach Wjst M, 1998)	3
Abb. 3	Genomische Struktur des IL4R-Gens mit nicht-synonymen SNPs (modifiziert nach Wu X et al., 2001)	11
Abb. 4	FSC/SSC- Diagramm mit Fenster um die Lymphozytenpopulation (Originalregistrierung)	38
Abb. 5	Abgrenzung der CD19-positiven Lymphozyten im SSC/FL2- Diagramm (Originalregistrierung)	39
Abb. 6	Negativkontrolle mit unspezifischer Hintergrundfluoreszenz im M1-Fenster (Originalregistrierung)	39
Abb. 7	SSP-PCR-Analysen	41
Abb. 8	Schematische Darstellung der Signaltransduktion	99
Tab. 1	SNPs im kodierenden Teil des IL4R-Gens	10
Tab. 2	Übersicht genomweiter Kopplungsanalysen zur Atopie	13
Tab. 3	IL4R: Genetische Assoziationsstudien	15
Tab. 4	Klinische Einteilung der Multiplen Sklerose (nach Lublin FD, Reingold SC, 1996)	16
Tab. 5	<i>In vitro</i> -Expressionsstudien der IL4R-SNPs	21
Tab. 6	Zusammensetzung der Multiple Sklerose-Patienten	28
Tab. 7	Parameter der sequenzspezifischen Primer der SSP-PCR	31
Tab. 8	<i>Thermo-Cycle</i> -Programm der SSP-PCR	33
Tab. 9	HLA-DRB1*15- <i>Primer</i>	33
Tab. 10	<i>Cycle</i> -Programm zur DNA-Sequenzierung	34
Tab. 11	Parameter der IL-4R Sequenzier- <i>Primer</i>	35
Tab. 12	Allelfrequenzen der IL4R-SNPs	42
Tab. 13	Kopplungsungleichgewichte zwischen den IL4R-SNPs	43
Tab. 14	Kalkulierte IL4R-Haplotypen	43
Tab. 15	Assoziation der biochemischen Atopiemarker mit der Atopieanamnese	44
Tab. 16	Assoziation der IL4R-SNPs mit Gesamt-IgE-Werten	45

Tab. 17	Genotypfrequenzen der IL4R-SNPs bei MS-Patienten und Kontrollpersonen	46
Tab. 18	Genotyp- und Allelfrequenzen der IL4R-Varianten S411L und Q551R bei MS-Patienten bezüglich des klinischen Verlaufs und im Vergleich mit der Kontrollgruppe	48
Tab. 19	Verteilung der IL4R-Varianten L411 und R551 bei HLA-DRB1*15-positiven und -negativen MS-Patienten und Prävalenz von HLA-DRB1*15 bezüglich des klinischen Verlaufs	49
Tab. 20	Vorversuche zur Ermittlung der optimalen IL-4-Konzentration und Stimulationsdauer	50
Tab. 21	IL4R-Genotypen der Probanden für die FACS-Analyse	51
Tab. 22	Mittelwert und Standardabweichung des relativen CD23-MFI-Anstiegs nach IL-4-Stimulation der Q551R-Genotypen	52
Tab. 23	Mittelwert und Standardabweichung des relativen CD23-MFI-Anstiegs nach IL-4-Stimulation der S478P-Genotypen	53
Tab. 24	Mittelwert und Standardabweichung des relativen CD23-MFI-Anstiegs nach IL-4-Stimulation der I50V-Genotypen	53
Tab. 25	IL4R-Allelfrequenzen (in %) verschiedener Populationen	56
Tab. 26	Frequenz (in %) der IL4R-Haplotypen	58
Tab. 27	Studien zur genetischen Assoziation von R551 mit Atopie-Phänotypen	59
Tab. 28	Studien zur genetischen Assoziation von I50 mit Atopie-Phänotypen	61
Tab. 29	Assoziationsstudien zwischen IL4R-SNPs und anderen Erkrankungen	65

9. ANHANG

9.1 Standartfragebogen Atopie

Name, Vorname:

Geburtsdatum:

Bestehen oder bestanden in der Vergangenheit bei Ihnen eine oder mehrere der unten aufgeführten Gesundheitsstörungen?

- | | | | |
|---|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Heuschnupfen oder Pollenallergie? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> weiß nicht |
| 2. Hausstauballergie? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> weiß nicht |
| 3. Allergisches Asthma bronchiale? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> weiß nicht |
| 4. Allergisches Hautekzem oder Neurodermitis? | <input type="checkbox"/> ja | <input type="checkbox"/> nein | <input type="checkbox"/> weiß nicht |
-

5. Ist bei Ihnen in der Vergangenheit ein Allergietest durchgeführt worden?

☐ ja ☐ nein ☐ weiß nicht

a) Falls der Allergietest positiv ausgefallen ist, gegen welche Substanzen reagieren Sie allergisch? _____

6. Müssen oder mussten sie wegen einer der oben aufgeführten allergischen Erkrankungen gelegentlich oder regelmäßig Medikamente einnehmen (z.B. Augentropfen, Nasensprays, Dosieraerosole für die Lunge, Tabletten, Salben)?
- ☐ ja ☐ nein ☐ weiß nicht

7. Sind bei Ihren leiblichen Eltern oder Ihren leiblichen Geschwistern eine oder mehrere der unter 1-4 aufgeführten allergischen Erkrankungen bekannt?

☐ ja ☐ nein ☐ weiß nicht

8. Sind Sie Raucher(-in), Exraucher(-in) oder Nichtraucher(-in) ?

☐ Raucher(-in) ☐ Exraucher(-in) ☐ Nichtraucher(-in)

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!

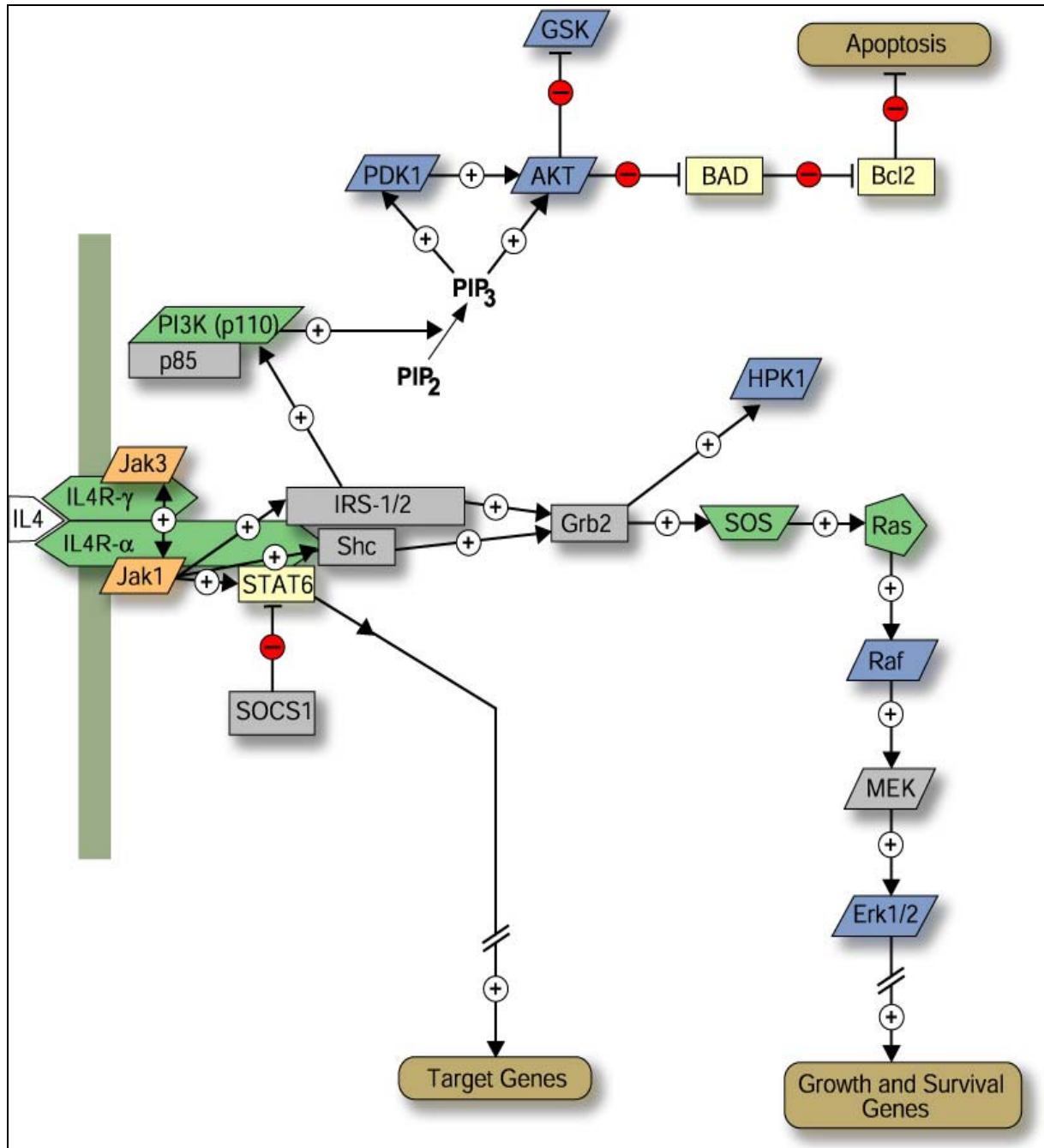
9.2 Nukleotidsequenz der mRNA des human IL4RA

```

1  ggcgaatgga  gcagggggcgc  gcagataatt  aaagattttac  acacagctgg  aagaaatcat
61  agagaagccg  ggcgtggtgg  ctcatgccta  taatcccagc  acttttggag  gctgaggcgg
121  gcagatcact  tgagatcagg  agttcogagc  cagcctgggtg  ccttggcatc  tcccaatggg
181  gtggctttgc  tctgggctcc  tgttccctgt  gagctgcctg  gtcctgctgc  aggtggcaag
241  ctctgggaac  atgaaggtct  tgcaggagcc  cacctgcgtc  tccgactaca  tgagcatctc
301  tacttgcgag  tggaagatga  atgggtccac  caattgcagc  accgagctcc  gcctgttgta
361  ccagctgggt  tttctgctct  ccgaagccca  cacgtgtatc  cctgagaaca  acggaggcgc
421  ggggtgctg  tgccacctgc  tcatggatga  cgtggtcagt  gcggataact  atacactgga
481  cctgtgggct  gggcagcagc  tgctgtggaa  gggctccttc  aagcccagcg  agcatgtgaa
541  acccagggcc  ccaggaaacc  tgacagttca  caccaatgtc  tccgacactc  tgctgctgac
601  ctggagcaac  ccgtatcccc  ctgacaatta  cctgtataat  catctcacct  atgcagtcaa
661  catttgaggt  gaaaacgacc  cggcagatgt  cagaatctat  aacgtgacct  acctagaacc
721  ctccctccgc  atcgagcca  gcacctgaa  gtctgggatt  tcctacaggg  cacgggtgag
781  ggctgggct  cagtgtctata  acaccacctg  gagtgtgtgg  agccccagca  ccaagtggca
841  caactcctac  agggagccct  tcgagcagca  cctcctgctg  ggcgtcagcg  tttcctgcat
901  tgtcatcctg  gccgtctgcc  tgttgtgcta  tgtcagcatc  accaagatta  agaaaagaatg
961  gtgggatcag  attcccaacc  cagcccgag  ccgcctcgtg  gctataataa  tccaggatgc
1021  tcaggggtca  cagtgggaga  agcgggtccc  aggcaggaa  ccagccaagt  gccacactg
1081  gaagaattgt  cttaccaagc  tcttgccttg  ttttctggag  cacaacatga  aaagggatga
1141  agatcctcac  aaggctgcca  aagagatgcc  tttccagggc  tctggaaaat  cagcatggtg
1201  cccagtggag  atcagcaaga  cagtctctg  gccagagagc  atcagcgtgg  tgcgatgtgt
1261  ggagttgttt  gaggcccg  tggagtgtga  ggaggaggag  gaggtagagg  aagaaaaagg
1321  gagcttctgt  gcatcgctg  agagcagcag  ggatgacttc  caggagggaa  gggagggcat
1381  tgtggccgg  ctaacagaga  gcctgttct  ggacctgctc  ggagaggaga  atgggggctt
1441  ttgccagcag  gacatggggg  agtcatgct  tcttccacct  tcgggaagta  cgagtgtctca
1501  catgccctgg  gatgagttcc  caagtgcagg  gcccaaggag  gcacctccct  ggggcaagga
1561  gcagcctctc  cacctggagc  caagtctctc  tgccagcccg  acccagagtc  cagacaacct
1621  gacttgacac  gagacgccc  tcgtcatcgc  aggcaaccct  gcttacgcga  gcttcagcaa
1681  ctcctgagc  cagtcaccgt  gtcccagaga  gctgggtcca  gacctactgc  tggccagaca
1741  cctggaggaa  gtagaacccg  agatgcctg  tgtccccag  ctctctgagc  caacctactgt
1801  gcccacacct  gagccagaaa  cctgggagca  gatcctccgc  cgaaatgtcc  tccagcatgg
1861  ggcagctgca  gccccgctc  cggccccac  cagtggctat  caggagtttg  tacatgcggt
1921  ggagcagggt  ggcacccagg  ccagtgcggt  ggtgggcttg  ggtccccag  gagaggctgg
1981  ttacaaggcc  ttctcaagcc  tgcttgccag  cagtgtctgt  tcccagaga  aatgtgggtt
2041  tggggctagc  agtggggaag  aggggtataa  gcctttccaa  gacctcattc  ctggctgcc
2101  tggggaccct  gcccagtc  ctgtcccctt  gttcaccttt  ggactggaca  gggagccacc
2161  tcgagctccg  cagagctcac  atctcccag  cagctcccca  gagcacctgg  gtctggagcc
2221  ggggaaaaag  gtagaggaca  tgccaaagcc  cccacttccc  caggagcagg  ccacagacc
2281  ccttgtggac  agcctgggca  gtggcattgt  ctactcagcc  cttacctgcc  acctgtgcgg
2341  ccacctgaaa  cagtgtcatg  gccaggagga  tgggtggccag  acccctgtca  tggccagtcc
2401  ttgtctgtgg  tgctgtctgt  gagacaggtc  ctcgccccct  acaaccccc  tgaggggccc
2461  agaccctct  ccagggtggg  ttccactgga  ggccagtctg  tgtccggcct  ccctggcacc
2521  ctcgggcatc  tcagagaaga  gtaaatcctc  atcatccttc  catcctgccc  ctggcaatgc
2581  tcagagctca  agccagacc  ccaaaatcgt  gaactttgtc  tccgtgggac  ccacatacat
2641  gagggctct  taggtgcatg  tctcttgg  gctgagctctg  cagatgagga  ctagggtcta
2701  tccatgcctg  ggaaatgcca  cctcctggaa  ggcagccagg  ctggcagatt  tccaaaagac
2761  ttgaagaacc  atggtatgaa  ggtgattggc  cccactgacg  ttggcctaac  actgggctgc
2821  agagactgga  ccccgcccag  cattgggctg  ggctcgccac  atcccatgag  agtagagggc
2881  actgggtcgc  cgtgccccac  ggcaggcccc  tgcaggaaaa  ctgaggccct  tgggacacctc
2941  gacttgtgaa  cgagttgttg  gctgtccct  ccacagcttc  tgcagcagac  tgtccctgtt
3001  gtaactgccc  aaggcatgtt  ttgccacca  gatcatggcc  cacgtggagg  cccacctgcc
3061  tctgtctcac  tgaactagaa  gccgagccta  gaaactaaca  cagccatcaa  gggaatgact
3121  tggggcgcc  tgggaaatcg  atgagaatt  gaacttcagg  gaggtgggtc  attgcctaga
3181  ggtgtcatt  catttaacag  agcttcccta  ggttgatgct  ggaggcagaa  tcccggtgtg
3241  caagggtgt  tcagttaagg  ggagcaacag  aggacatgaa  aaattgctat  gactaaagca
3301  gggacaattt  gctgccaaac  acccatgccc  agctgtatgg  ctgggggctc  ctctgtatgca
3361  tggaaacccc  agaataaata  tgctcagcca  ccctgtgggc  cgggcaatcc  agacagcagg
3421  cataaggcac  cagttaccct  gcatgttggc  ccagacctca  ggtgctaggg  aaggcgggaa
3481  ccttgggttg  agtaatgctc  gtctgtgtgt  tttagtttca  tcacctgtta  tctgtgtttg
3541  ctgaggagag  tggaacagaa  ggggtggagt  tttgtataaa  taaagtttct  ttgtctc

```

9.3 Abb. 8: Schematische Darstellung der Signaltransduktion
(modifiziert nach www.cellular-signaling.org)



10. DANKSAGUNG

Der praktische Teil dieser Arbeit entstand im Zeitraum von April 1998 bis September 2000 am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig Universität in Gießen.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Gregor Bein möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und für die Bereitstellung der notwendigen Mittel und Räumlichkeiten bedanken. Er war bei Fragen und Problemen immer zum Gespräch bereit.

Herrn PD Dr. Holger Hackstein danke ich für die exzellente Einarbeitung und engagierte persönliche Betreuung bei einem Großteil der Arbeit.

Ebenso gilt mein ausdrücklicher Dank Frau Dr. Anette Bohnert für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Laborarbeiten und ihre Diskussionsbereitschaft auf vielen Gebieten.

Ich danke den Mitarbeitern des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Gießen für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt allen Blutspendern und MS-Patienten, die durch ihre bereitwillige Blutspende diese Arbeit ermöglicht haben.

Für die Zurverfügungstellung der DNA der Multiplen Sklerose-Patienten bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Sigrid Poser, Herrn Dr. Andreas Bitsch und Herrn Dr. Frank Weber aus der neurologischen Universitätsklinik Göttingen (Direktor: Prof. Dr. med. Bähr) und bei Herrn Dr. Matthias Mäurer und Herrn Dr. Peter Rieckmann von der neurologischen Universitätsklinik Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. Toyka).

Dr. Papst vom Institut für Medizinische Statistik in Gießen danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung. Bei Prof. Dr. Dr. B. Schill, Dr. F. M. Köhn und B. Christophel von der Dermatologischen Klinik in Gießen bedanke ich mich für die Analyse der biochemischen Atopiemarker.

Bei meiner Mutter möchte ich mich für die Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung, insbesondere für ihre rückhaltlose Hilfe und inspirierenden Ideen bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

11. LEBENS LAUF

Henrike Annette Hofmann
geb. am 25.08.1975 in Potsdam

Mutter: Dr. Annette Hofmann, Kieferorthopädin
Vater: Siegfried Hofmann, medizinischer Präparator

1981	Übersiedlung in die BRD
1982-1986	Max-Tau-Grundschule in Kiel
1986-1989	Käthe-Kollwitz-Gymnasiums in Kiel
1989-1995	Ratsgymnasiums in Wolfsburg
Mai 1995	Allgemeine Hochschulreife
April 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig Universität in Gießen
März 1998	Ärztliche Vorprüfung
April 1998	Beginn der Doktorarbeit am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr. med. G. Bein)
März 1999	1. Staatsexamen
April 2001	2. Staatsexamen
April 2001	Beginn des Praktisches Jahres (Wahlfach Dermatologie im UniversitätsSpital Zürich – Direktor: Prof. Dr. med. G. Burg)
April 2002	3. Staatsexamen
Juli 2002- Dez. 2003	Ärztin im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie an der Universitätsklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. T. Bieber)
Jan. 2004	Assistenzärztin an der Hautklinik des Klinikums Minden (Chefarzt: Prof. Dr. R. Stadler), Akademisches Lehrkrankenhaus der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

12. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen genomweiter Kopplungsanalysen zeigten zahlreiche chromosomale Regionen und Kandidatengene signifikante Kopplung mit Atopie-Phänotypen, darunter das Gen für die Interleukin-4 Rezeptor-alpha-Kette (IL4R) auf Chromosom 16p12. Interleukin-4 (IL-4) besitzt eine immunregulatorische Schlüsselrolle in der T-Helferzell-2 (Th2) Immunantwort und damit auch in der Induktion der IgE-Synthese. Während die Aminosäuresequenz anderer Zytokin-Rezeptorketten hochgradig konserviert ist, wurden im IL4R-Gen zahlreiche *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) beschrieben, die zu einem Aminosäureaustausch führen (nicht-synonyme IL4R-SNPs). Strukturelle Varianten der IL-4R α -Kette wurden daher mit einer veränderten Signalübertragung und verschiedenen Erkrankungen, in deren Pathogenese eine Fehlsteuerung der Th1/Th2-Balance postuliert wird, assoziiert.

In dieser Arbeit präsentieren wir erstmals die Haplotyp-Blockstruktur im IL4R-Gen. Nach sequenzspezifischer Amplifikation von sieben nicht-synonymen IL4R-SNPs bei insgesamt 158 gesunden Probanden konnten elf putative IL4R-Haplotypen identifiziert werden, von denen vier eine kumulative Frequenz von >90% erreichen. Zwischen den Genabschnitten, die für die intrazelluläre und extrazelluläre Domäne des Rezeptormoleküls kodierenden, befindet sich ein Rekombinations-*Hotspot*. Beide Teile des Gens verhalten sich im Rahmen von Assoziationsstudien wie unabhängig vererbte Gene.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Assoziationsstudie an gesunden Probanden (n= 158) zeigt, dass in der Gesamtgruppe keiner der untersuchten IL4R-SNPs mit anamnestischen oder biochemischen Atopie-Phänotypen assoziiert ist. Allerdings zeigen die seltenen SNPs einen Trend zu niedrigeren Gesamt-IgE-Spiegeln. Diese Assoziation war für die Varianten A375, R406 und P478 in der Gruppe der Nicht-Atopiker (n= 90) signifikant ($p < 0,05$). Ferner zeigen die Varianten R551 und P478 eine verminderte IL-4-induzierte CD23-Expression auf B-Lymphozyten. Daher stellen wir die Hypothese auf, dass die untersuchten IL4R-SNPs in unterschiedlichem Ausmaß mit relativer Hemmung der IL-4-induzierten Signaltransduktion assoziiert sind. Dies führt konsekutiv zu niedrigeren Gesamt-IgE-Spiegeln. Die untersuchten Genvarianten könnten den basalen IgE Spiegel modulieren, stellen jedoch vermutlich keinen Suszeptibilitätsfaktor für atopische Erkrankungen dar.

Eine kürzlich durchgeführte Kandidatengenstudie ergab eine mögliche Kopplung der Multiplen Sklerose (MS) mit IL4R. Die vorliegende Assoziationsstudie an 332 MS-Patienten zeigt, dass die R551-Variante möglicherweise mit der Subform der primär progressiven MS (PPMS) assoziiert ist ($p = 0,001$), aber keinen generellen genetischen Risikofaktor für die MS darstellt. Die verminderte IL-4-Rezeptorfunktion könnte zu einer Th1-dominierten

Immunantwort prädisponieren, die eine wichtige Rolle in der MS-Pathogenese spielt. Dennoch ist es interessant, dass R551 häufiger bei MS-Patienten mit Autoantikörpern gegen *Myelin-oligodendrocyte-glycoprotein* (MOG) vorkommt.

Die große genetische Variabilität im IL4R-Gen wird auf evolutionäre Selektionsmechanismen zurückgeführt. So ist eine Th1-dominierte Immunantwort für die Abwehr von bakteriellen Infektionen erforderlich, während eine Th2-dominierte Immunantwort zur Elimination von Parasiten beiträgt. Die genetische Variabilität an einem Schlüsselgen der Th1/Th2-Balance wäre mit der Resistenz einer Population gegen verschiedene Klassen von Krankheitserregern assoziiert. Die Bedeutung der IL4R-SNPs in der Abwehr parasitärer Erkrankungen werden zukünftige Untersuchungen klären müssen.

12. SUMMARY

In the context of genome wide candidate gene studies several chromosomal regions and candidate genes showed a significant linkage to atopic phenotypes, including the gene for the interleukin-4 receptor alpha chain (IL4RA) on chromosome 16p12. Interleukin-4 (IL-4) plays a key immunoregulatory role in the T helper 2 (Th2) cell response and therefore in the induction of IgE- synthesis. While the amino acid sequences of other cytokine receptors are strongly conserved, in the IL4R-gene numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) were described who determine an amino acid transfer (non-synonymous IL4R-SNPs). Structural variants of IL-4R α chain were associated with a modulation of receptor signalling and different diseases in which pathogenesis a disorder of Th1/Th2-balance is postulated.

In this study we present for the first time the haplotype block structure of IL4R. After sequence specific amplification of seven non-synonym IL4R-SNPs in 158 healthy probands eleven putative IL4R-haplotypes could be identified including four with a cumulative frequency of >90%. Between the regions that encode for the intracellular and extracellular domain of the receptor molecule there is a recombination hotspot located. Both parts act in association studies like independently inherited genes.

Analyses of healthy probands (n=158) showed that none of the examined IL4R-SNPs was associated with anamnestic or laboratory atopic phenotype. However, the rare variants showed a trend toward decreased total IgE levels. This association was significant ($p < 0,05$) for the A375, R406, and P478 variants in the group of non-atopics (n=90). Furthermore, the variants R551 and P478 showed a decreased IL-4 induced CD23-expression on B-lymphocytes. Therefore we hypothesise that the investigated IL4R-SNPs are associated to different extends with a relative inhibition of IL-4 induced signalling. This leads consecutively to decreased IgE- levels. The examined gene variants may modulate the basal IgE-level, but presumably do not present a susceptibility factor for atopic diseases.

A recent candidate gene study suggested a possible linkage of multiple sclerosis (MS) with IL4R. The present association study with 332 MS-patients showed that R551 was associated ($p=0,001$) with the subgroup for primary progressive MS (PPMS), but does not represent a general genetic risk factor for MS. The decrease in IL-4 receptor function may predispose to a Th1-dominated immune response, which plays an important role in MS-pathogenicity. Nevertheless, it is interesting that R551 was also found more frequently in patients with autoantibodies against myelin-oligodendrocyte-glycoprotein (MOG).

The wide variability in IL4R-gene is attributed to evolutionary mechanisms of selection. Thus, Th1-dominated immune response is responsible for defence of intracellular bacterial

infections where as Th2-dominated immune response is necessary to eliminate parasites. The genetic variability of a key gene modulating the Th1/Th2-balance would be associated with the resistance of a population against different pathogens. The role of IL4R-SNPs in the defence of parasites will be clarified in future investigations.